

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM UMR_S 1109

THÈSE présentée par :

Jéromine KLINGLER

soutenue le : **28 juin 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Virologie**

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH

THÈSE dirigée par :

Mme MOOG Christiane

Directrice de recherche, INSERM, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BRAIBANT Martine

M. VERRIER Bernard

Maître de conférences, Université de Tours

Directeur de recherche, CNRS, Lyon

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. PAILLART Jean-Christophe

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg

INVITÉ :

M. BOUTANT Emmanuel

Maître de conférences, Université de Strasbourg

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Docteur BRAIBANT Martine, le Docteur VERRIER Bernard, le Docteur PAILLART Jean-Christophe et le Docteur BOUTANT Emmanuel pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur BAHRAM Seiamak pour m'avoir acceptée dans son unité.

A ma Directrice de Thèse, le Docteur MOOG Christiane, merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse sur ce sujet qui me passionne. Merci pour votre investissement dans ce travail et pour tous les conseils qui m'auront permis de progresser. Un grand merci pour les nombreuses opportunités que j'ai eues durant ma thèse et les nombreuses conférences auxquelles j'ai pu participer !

A toute l'équipe virologie, merci pour votre accueil et pour le soutien que vous m'avez apportés durant ma thèse ! Merci à Sylvie pour son aide sur toutes les expériences et à Camille pour son soutien ! Un énorme merci à Nathalie pour les nombreuses relectures et les nombreux conseils pour les présentations orales ou autres sujets ! Merci à Lucille et Alexis pour votre présence durant ces derniers mois et pour tous les moments agréables passés ensemble !

Un merci plus particulier à ma deuxième maman, Géraldine, qui m'a tout appris ou presque ainsi qu'à Luzia pour son amitié et son aide dans tous les domaines ! J'ai adoré travailler avec vous et partager bien plus que le travail durant ces années de thèse !

Merci à mes parents et à mes trois grandes sœurs Elodie, Marie et Charline pour leur soutien sans faille. Je n'en serai pas là sans vous ! Merci également à mes deux beaux-frères Sébastien et Manala ainsi qu'au « soon-to-be » beau-frère Cricri !

A ma filleule Noémie, mes nièces Louison, Lucie et Elise et mes neveux Gauthier et Gabin, merci pour tout le bonheur que vous m'apportez !

Merci à toute ma famille ainsi qu'à la famille Rybak pour leurs encouragements et plus particulièrement à Grand-Maman, à la famille Ducamp et à mon cousin presque-de-sang Cyrille !

A mes amies de toujours, Marion, Félicia, Hélène, Claire, Sophie, Léonie et Marie, merci pour toutes ces années passées ensemble et merci d'être toujours là !

A mes amis d'hier et d'aujourd'hui, José, Pierre-André, Joseph, Christine, Elodie, Régis, Claire, Valentin, Fanny, Céline, Thomas, Steve, Marie, Marion, Ben, Justine, Loïc, Xavier et Anne merci pour tous les bons moments passés ensemble !

A Cindy, merci pour tous ces bons moments partagés et pour ton oreille attentive ! Merci d'être l'amie qui débarque en cinq minutes (même en pleine nuit) parce que j'ai besoin de toi !

A Manu, merci pour ton soutien, les soirées mémorables (sportives ou non) et les rires partagés et merci d'être un ami sur lequel on peut compter !

A Belinda, merci d'être toujours là pour moi depuis toutes ces années, merci pour tous les moments de folies qu'on a partagés et pour tous ceux à venir !

A Pierre, merci d'avoir été là pour moi, je n'y serai pas arrivée sans toi !

A mon petit chat, Jonathan, merci pour ton soutien inconditionnel, ton optimisme à toute épreuve et merci d'être le cas soc dont j'ai toujours rêvé !

« Rêve ta vie en couleur, c'est le secret du bonheur »

(Walter Elias Disney)

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Liste des abréviations	5
Contexte général	9
Introduction.....	11
I. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)	13
A. Généralités sur le VIH	13
1. Classification.....	13
2. Historique	13
a. Découverte	13
b. Origine et évolution phylogénétique	14
c. Dates clés de la recherche sur le VIH-1	16
3. Données épidémiologiques	18
4. Objectifs Horizon-2020.....	20
B. Structure et réplication du VIH-1	22
1. Génome du VIH-1	22
2. Protéines d'enveloppe du VIH-1.....	23
a. gp120.....	23
b. gp41.....	25
3. Particule virale du VIH-1	26
4. Cycle de réplication du VIH-1	27
a. Phase précoce	28
i. Reconnaissance, fusion et entrée	28
ii. Transcription inverse	29
iii. Intégration au génome de la cellule cible	30
b. Phase tardive.....	30
i. Transcription de l'ADN proviral.....	30
ii. Traduction des ARN messagers.....	31
iii. Assemblage et bourgeonnement.....	32
iv. Maturation de la particule virale	32
Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients	
contrôleurs du VIH	

5. Cellules cibles du VIH-1	32
C. Prévention et traitements contre l'infection par le VIH-1	35
1. Dépistage.....	35
2. Prévention	36
3. Les microbicides	37
4. Thérapie antirétrovirale	38
a. Objectifs du traitement antirétroviral.....	38
b. Quand débiter un traitement antirétroviral ?.....	39
c. Traitement recommandé	39
d. Mécanisme d'action des différentes classes thérapeutiques	39
e. Efficacité immuno-virologique	43
f. Molécules antirétrovirales commercialisées.....	43
g. Combinaisons thérapeutiques	44
h. Effets indésirables	45
D. Caractéristiques biologiques et cliniques du VIH-1.....	46
1. Modes de transmission	46
2. Physiopathologie	47
3. Réservoir du VIH-1.....	49
a. Diversité cellulaire et distribution anatomique.....	49
b. Techniques de mesure du réservoir.....	51
4. Cas particuliers des patients HIC et LTNP	51
II. Réponse immunitaire face à l'infection par le VIH-1	54
A. Réponse cellulaire adaptative.....	54
1. Lymphocytes T CD4 ⁺ auxiliaires.....	54
2. Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques	56
B. Réponse humorale.....	56
1. Lymphocytes B	56
2. Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques du VIH-1 <i>in vivo</i>	57
3. Mécanismes d'inhibition du VIH-1 par les anticorps.....	58
a. Neutralisation.....	59
b. Mécanismes liés aux récepteurs Fcγ	60
i. Immunologie des récepteurs Fcγ	60
ii. Antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP)	62
iii. <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (ADCC)	63

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

iv. <i>Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI)</i>	63
v. <i>Antibody-dependent complement deposition (ADCD)</i>	64
vi. <i>Antibody-dependent cellular trogocytosis (ADCT)</i>	64
4. Sous-types d'IgG et contrôle du VIH-1	65
a. IgG1	68
b. IgG2	69
c. IgG3	69
d. IgG4	69
5. Anticorps neutralisants dirigés contre l'enveloppe du VIH-1.....	70
a. Anticorps dirigés contre le site de fixation au CD4	70
b. Anticorps dirigés contre le sommet de la boucle V2 de la gp120	71
c. Anticorps dirigés contre le glycan de la boucle V3 de la gp120	71
d. Anticorps dirigés contre la région MPER de la gp41	71
e. Anticorps dirigés contre l'interface gp120/gp41.....	71
f. Anticorps dirigés contre la face silencieuse de la gp120.....	72
6. Etude du rôle des anticorps <i>in vivo</i>	72
7. Anticorps neutralisants en thérapie	73
C. Réponse immunitaire des patients contrôleurs.....	77
1. Réponses cellulaires particulièrement efficaces chez certains patients HIC.....	77
2. Réponse humorale des HIC	78
a. Lymphocytes B mémoires préservés.....	78
b. Induction d'anticorps neutralisants variable selon les patients.....	79
c. Implication des activités médiées par le domaine Fc dans le contrôle viral des patients HIC.....	79
3. Implication des sous-types d'IgG dans le contrôle viral des patients HIC et LTNP	80
Objectifs du travail de thèse	83
Matériel et méthodes	87
I. Cohortes	89
II. Purification des IgG3 et IgG1,2,4	89
III. ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	90
A. Dosage des IgA totales et spécifiques du VIH	90
B. Dosage des IgG totales et spécifiques du VIH	91
C. Dosage des IgG2 totales et spécifiques du VIH	91
Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH	

D.	Dosage des IgG3 totales et spécifiques du VIH	92
E.	Calculs des ratios d'immunoglobulines spécifiques du VIH	92
IV.	Culture cellulaire	92
A.	Lignées cellulaires	92
1.	TZM-bl	92
2.	CEM.NKR.CCR5	93
3.	293T	93
B.	Cellules primaires.....	93
V.	Préparation du virus.....	94
VI.	Tests de neutralisation du VIH par les anticorps	97
VII.	Test de neutralisation et de phagocytose	97
VIII.	Test d'activité de lyse cellulaire (ADCC)	98
IX.	Cytométrie en flux	99
X.	Diagramme en radar	100
XI.	Analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA)	100
XII.	Analyses statistiques.....	100
Résultats.....		103
Publication 1		105
Publication 2		141
Publication 3		163
Conclusions et perspectives		209
Bibliographie		223
Annexes.....		251
Publication 4		253
Publication 5		267
Résumé		279
Abstract		279

Liste des figures

Figure 1 : Phylogénie du VIH-1 (Adapté de (Tebit and Arts 2011)).....	16
Figure 2 : Dates clés de la recherche sur le VIH-1 (Adapté de (Barré-Sinoussi, Ross, and Delfraissy 2013)).	18
Figure 3 : Répartition mondiale des personnes vivant avec le VIH, des nouvelles infections par le VIH et des décès causés par le VIH en 2017 (“ONUSIDA / UNAIDS,” n.d.).....	20
Figure 4 : Cascade de la prise en charge des personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2017, en comparaison de l’objectif Horizon-2020.....	21
Figure 5 : Organisation du génome du VIH-1 (Adapté de (Mirande 2008)).....	23
Figure 6 : Structure cristalline du trimère Env du VIH-1 mature (Kwon et al. 2015).	25
Figure 7 : Particule virale du VIH-1.	27
Figure 8 : Schéma simplifié du cycle de réplication du VIH-1 (Adapté de (Bauby, Lopez-Vergès, and Berlioz-Torrent 2008)).	28
Figure 9 : Cellules cibles du VIH-1 et distribution anatomique (Adapté de (Barton, Winckelmann, and Palmer 2016)).	34
Figure 10 : Cibles des différentes classes thérapeutiques d’antirétroviraux.....	43
Figure 11 : Evolution naturelle de l’infection par le VIH-1.....	49
Figure 12 : Distribution anatomique des réservoirs du VIH-1 (Adapté de (Avettand-Fènoël et al. 2016)).	50
Figure 13 : Différences d’évolution face à l’infection par le VIH-1.	53
Figure 14 : Différenciation d’un lymphocyte CD4 ⁺ naïf en lymphocyte T <i>helper</i> (Rouers, Jeger-Madiot, et al. 2017).	55
Figure 15 : Réponse humorale face à l’infection par le VIH-1 au cours du temps (Adapté de (Alter and Moody 2010)).	58
Figure 16 : Différents mécanismes d’inhibition du VIH-1 par les anticorps (Adapté de (Peressin, Holl, and Moog 2014)).	59
Caractérisation du profil d’anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH	

Figure 17 : Expression des récepteurs Fcγ humains en fonction du type de cellule (Gillis et al. 2014).	62
Figure 18 : Différence de structures des quatre sous-types d'immunoglobulines G (IgG) (Adapté de (Vidarsson, Dekkers, and Rispens 2014)).	66
Figure 19 : Affinité des quatre sous-types d'immunoglobulines G (IgG) pour les récepteurs Fcγ (Gillis et al. 2014).	67
Figure 20 : Sites de reconnaissance des principaux anticorps neutralisants (Adapté de (Sok and Burton 2018)).	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Molécules antirétrovirales commercialisées en France en 2017 (Adapté de ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.)).	44
Tableau 2 : Présentations combinées de molécules antirétrovirales commercialisées en France en 2017 (Adapté de ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.)).	45
Tableau 3 : Essais vaccinaux contre le VIH de phase II/III (Adapté de (Lelièvre and Lévy 2016)).	76
Tableau 4 : Caractéristiques des virus utilisés pour les expériences de thèse.	96
Tableau 5 : Récapitulatif des études sur l'implication de la réponse cellulaire adaptative chez les patients HIC.	211
Tableau 6 : Récapitulatif des études sur l'implication de la réponse anticorps chez les patients HIC et LTNP.	213

Liste des abréviations

A

Ac : anticorps
AcN : anticorps neutralisant
AcNoNI : anticorps non neutralisant inhibiteur
ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*
ADCD : *antibody-dependent complement deposition*
ADCP : *antibody-dependent cellular phagocytosis*
ADCT : *antibody-dependent cellular trogocytosis*
ADCVI : *antibody-dependent cell-mediated virus inhibition*
ADN : acide désoxyribonucléique
AIDS : *acquired immune deficiency syndrome*
AIE : anémie infectieuse des équidés
ALT : asymptomatiques à long terme
AM : *activated memory*
AMM : autorisation de mise sur le marché
ANRS : Agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales
APOBEC3G : *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNt^{Lys,3} : isoaccepteur de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
AUC : *area under the curve*
AZT : azidothymidine

B

bnAbs : *broadly neutralizing antibodies*
BSA : *bovine serum albumine*
BSL3 : *biosafety level 3*

C

CA : capside
CCR5 : *C-C chemokine receptor type 5*
CD4 : cluster de différenciation 4
CD46 ou MCP : *membrane cofactor protein*
CD55 ou DAF : *decay-accelerating factor*
CD8 : cluster de différenciation 8
CDC : *Center for Disease Control and Prevention*
CDR3 : *complementarity determining region 3*
CHR : *C-terminal heptad repeat*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CRF : *circulating recombinant form*
CST : *cytometer setup and tracking*
CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*
CYP3A4 : cytochrome P450 3A4

D

DCI : dénomination commune internationale
DC-SIGN : *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing-non-integrin*
DEAE : diéthylaminoéthyle
DMEM : *Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*
DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

HVTN : *HIV Vaccine Trials Network*

E

EC : *elite controllers*

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

EFS : établissement français du sang

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

env : gène des protéines d'enveloppe

F

Fab : *fragment antigen binding*

Fc : fragment cristallisable

G

gag : *group-specific antigen*, gène des protéines de structure

GM-CSF : *granulocyte colony stimulating factor*

gp : glycoprotéine

GPI : glycosylphosphatidylinositol

H

h : heure

HAART : *highly active antiretroviral treatment*

HCDR3 : *heavy chain complementarity-determining region 3*

HEK 293 : *human embryonic kidney 293 cells*

HIC : *HIV controllers*

HLA : *human leukocyte antigen*

hMR : *human mannose receptor*

HRP : *horseradish peroxidase*

HTLV : *human T cell leukemia/lymphoma virus*

I

IC50 : concentration inhibitrice 50 %

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IE : inhibiteur d'entrée

IF : inhibiteur de fusion

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

II : inhibiteur de l'intégrase

IL : interleukine

IM : *intermediate memory*

IMC : *infectious molecular clone*

IMC LucR : *Renilla luciferase-expressing infectious molecular clone*

IN : intégrase

INTI : inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

INNTI : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

InVS : Institut de veille sanitaire

IP : inhibiteurs de la protéase

IRD50 : *inhibitory reciprocal dilution 50 %*

ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

iTreg : lymphocyte T *helper* régulateurs induits

K

kb : kilobase

L

LAV : *lymphadenopathy associated virus*

LB : lymphocyte B

LPS : lipopolysaccharide

LT : lymphocytes T

LTfh : *follicular helper T cells*

LTh : lymphocyte T *helper*

LTNP : *long-term non-progressors*

LTR : *long terminal repeat*

M

MA : matrice

MdM : macrophages dérivés de monocytes

µg : microgramme

mg : milligramme

µL : microlitre

mL : millilitre

MLV : virus de la leucémie murine

µM : micromolaire

MPER : *membrane proximal external region*

N

N9 : nonoxynol-9

NC : nucléocapside

Nef : *negative regulatory factor*

NGS : *next-generation sequencing*

NHP : *non-human primate*

NHR : *N-terminal heptad repeat*

NK : *natural killer*

nm : nanomètre

nTreg : lymphocyte T *helper* régulateurs naturels

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONUSIDA : Programme commun des Nations

Unies sur le VIH/sida

P

PBMC : *peripheral blood mononuclear cell*

PBS : *phosphate buffered saline*

PHA : phytohémagglutinine

PIC : complexe de pré-intégration

PLS-DA : analyse discriminante des moindres

carrés partiels ou *partial least-squares*

discriminant analysis

pol : gène des protéines enzymatiques

Pr : professeur

PR : protéase

PrEP : prophylaxie préexposition

p-TEFB : *positive transcription elongation*

factor b

Q

QVOA : *quantitative viral outgrowth assay*

R

RFc : récepteur pour le domaine Fc des immunoglobulines

RLU : *relative light unit*

RM : *resting memory* (RM)

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

medium

RSV : virus du sarcome de Rous

RT : transcriptase inverse

RT-PCR : *reverse transcription polymerase chain reaction*

S

sida : syndrome d'immunodéficience acquise

SHIV : *simian-human immunodeficiency virus*

SP : *spacer peptide*

sPLS-DA : analyse discriminante par les moindres carrés partiels éparpillés ou *sparsed partial least-squares discriminant analysis*

SVF : sérum de veau fœtal

T

TasP : *treatment as prevention*

TCR : récepteurs aux lymphocytes T

T/F : transmis/fondateur

Tfr : lymphocyte T folliculaire *helper* régulateurs

TGF : *transforming growth factor*

T-LCL : *cloned human T lymphoblastoid cell line*

TLM : *tissue like memory*

TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

TNF : *tumor necrosis factor*

Treg : lymphocyte T *helper* régulateur

TRIM21 : *tripartite motif-containing protein*

21

V

VIB : virus de l'immunodéficience bovine

Vif : *viral infectivity factor*

VIF : virus de l'immunodéficience féline

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : virus de l'immunodéficience simienne

VIscpzPtt : virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé

VISgor : virus de l'immunodéficience simienne du gorille

Vpr : *viral protein r*

Symboles

°C : degré Celsius

Contexte général

Depuis le début de l'épidémie dans les années 1980, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a infecté plus de 75 millions de personnes et a provoqué plus de 35 millions de décès dans le monde. Trente-cinq ans après sa découverte, les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de ce virus ont considérablement augmenté.

De nos jours, bien que les traitements antirétroviraux parviennent à contrôler la réplication du virus, l'infection par le VIH demeure un problème de santé publique majeur, avec 37 millions de personnes infectées en 2017 et un million de décès liés au VIH, selon la dernière estimation du Programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida (ONUSIDA). La moitié de la population infectée n'a pas accès aux traitements antirétroviraux et deux millions de nouvelles infections sont enregistrées chaque année. En outre, il n'existe actuellement aucun traitement curatif ou vaccin préventif qui pourrait permettre d'endiguer l'épidémie et les traitements antirétroviraux doivent être maintenus à vie.

La recherche d'un vaccin à visée curative ou préventive reste donc un enjeu majeur dans la lutte contre l'infection par le VIH.

De façon très intéressante, une très faible proportion de personnes infectées par le VIH est capable de contrôler spontanément la réplication du virus, maintenant une charge virale indétectable en absence de traitement antirétroviral. Ces individus, appelés « contrôleurs du VIH », représentent un groupe unique afin d'identifier des réponses immunitaires associées au contrôle de l'infection.

Le but de cette thèse est de caractériser la réponse anticorps induite chez ces patients contrôleurs afin d'identifier des anticorps efficaces à induire par vaccination.

Introduction

I. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

A. Généralités sur le VIH

1. Classification

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) appartient à la famille des **Rétrovirus** ou **Retroviridae**. Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui se répliquent à partir d'un génome diploïde de type ARN simple brin de polarité positive. Leur nom vient de l'enzyme qu'ils possèdent : la transcriptase inverse, qui permet la transcription inverse de l'ARN viral en ADN. Cette enzyme a été découverte en 1970 par Howard Temin (Temin and Mizutani 1992) chez le RSV (virus du sarcome de Rous) et par David Baltimore chez le MLV (virus de la leucémie murine) et le RSV (Baltimore 1970).

La famille des rétrovirus possède des caractéristiques structurales, morphologiques et fonctionnelles communes. Les rétrovirus possèdent ainsi des gènes *gag*, *pol* et *env* qui permettent respectivement la synthèse des protéines structurales, enzymatiques et d'enveloppe.

Les rétrovirus sont classés par l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) selon les similarités des séquences des gènes *pol* et selon la composition des génomes viraux. Le VIH appartient ainsi à la sous-famille des **Orthoretrovirinae** et au genre **Lentivirus** (du Latin : lenti = lent), caractérisant les virus ayant une longue période d'incubation avant que la maladie ne se déclare du fait de leur cytopathogénicité (Campbell and Robinson 1998).

Plusieurs espèces de mammifères sont touchées par cette famille de virus, qui présente des caractéristiques espèce-dépendantes (organisation du génome, évolution...) :

- les bovins : virus de l'immunodéficience bovine (VIB),
- les équidés : anémie infectieuse des équidés (AIE),
- les félins : virus de l'immunodéficience féline (VIF),
- et les primates : virus de l'immunodéficience simienne (VIS) et VIH.

2. Historique

a. Découverte

En 1981, le CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) a détecté une augmentation

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

anormale chez de jeunes malades homosexuels de deux maladies très rares : la pneumocystose et le sarcome de Kaposi. Tous les malades présentaient un effondrement du taux de leurs lymphocytes T CD4⁺. La maladie semblait alors toucher essentiellement des personnes homosexuelles, c'est pourquoi on l'a appelé le « gay syndrome » ou le « gay cancer ». C'est en 1982 que le CDC baptisa cette nouvelle pathologie du nom d'*acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) ou syndrome de l'immunodéficience acquise (sida).

En 1983, le groupe du Pr Montagnier de l'Institut Pasteur de Paris a détecté un pathogène et a mis en évidence une activité de transcriptase inverse dans des cellules isolées à partir de ganglions d'un patient présentant les signes précoces du sida. Cet agent pathogène est alors nommé le LAV (*lymphadenopathy associated virus*) (Barré-Sinoussi et al. 1983; Chermann et al. 1983). Ce virus infecte les lymphocytes T mais se révèle être distinct du HTLV-1 (*human T cell leukemia/lymphoma virus* de type I), qui est le premier rétrovirus humain découvert en 1980 par l'équipe du Pr Gallo (Poiesz et al. 1980). En 1984, cette équipe a aussi isolé le virus HTLV-3 (*human T cell leukemia/lymphoma virus* de type III) qui s'avéra être identique au LAV (Gallo et al. 1984). En 1986, l'ICTV adopta le nom de VIH au lieu de LAV ou HTLV-3. Au cours de cette même année, le Pr Montagnier découvre chez des malades d'origine africaine un second type de virus, aujourd'hui appelé VIH-2. Sa structure est identique à celle du VIH-1, mais son code génétique est très proche du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) qui infecte plus particulièrement un singe africain : le mangabey (Clavel et al. 1986).

Les Prs Barré-Sinoussi et Montagnier furent récompensés en 2008 par le prix Nobel de médecine pour la découverte du VIH.

b. Origine et évolution phylogénétique

Le VIH semble être apparu dans les années 1920 dans la région de Kinshasa (aujourd'hui en République Démocratique du Congo) (Faria et al. 2014). Il s'agirait d'une transmission inter-espèces durant laquelle l'Homme aurait été en contact avec des tissus contaminés de primates (chasse de viande de brousse, primates comme animal de compagnie...). Cette datation approximative de l'origine de la transmission du virus à l'Homme a été permise grâce à l'étude de l'évolution génétique du virus, effectuée à partir du plus ancien échantillon humain positif pour le VIH (biopsie d'un nœud lymphatique prélevée en 1960 chez une femme de Kinshasa). Les études phylogénétiques (**Figure 1**) de différents rétrovirus rappellent la grande diversité génétique du VIH-1, qui constitue un des obstacles majeurs de son éradication (Smyth,

Davenport, and Mak 2012). Elles permettent également de montrer que le VIH-1 est plus proche du virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé (VIScpzPtt) (Keele et al. 2006) en ce qui concerne les groupes M et N, ou du gorille (VISgor) en ce qui concerne les groupes P et O (D'arc et al. 2015). Quant au VIH-2, il serait apparu suite à une transmission inter-espèces avec des mangabeys (VISsm) (Reeves and Doms 2002).

Le VIH-1 est ainsi classé en 4 groupes (**Figure 1**) (Mourez, Simon, and Plantier 2013) :

- **Groupe M** (*major*, majeur) : il regroupe les virus à l'origine de la pandémie du sida. En effet, ils sont responsables de 99 % des infections, soit plus de 40 millions de personnes infectées à travers le monde. Il s'agit aussi de la lignée de virus la plus ancienne. Ce groupe est divisé en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K), tous distincts génétiquement. Il existe également dans les sous-groupes A et F des sous-sous-groupes (A1, A2, A3, A4, F1 et F2). Quand un patient est co-infecté par plusieurs sous-types de virus, une forme recombinante apparaît (*circulating recombinant form* (CRF), plus de 90 formes identifiées) accentuant encore la diversité génétique du virus.
- **Groupe N** (non-M, non-O) : il est plus rare et retrouvé uniquement chez des personnes originaires du Cameroun.
- **Groupe O** (*outlier*, aberrant) : il est aussi rare (environ 100 000 personnes infectées) et a été décrit suite à l'isolement d'une nouvelle souche très différente du groupe M (De Leys et al. 1990). Il est retrouvé uniquement en Afrique centrale de l'ouest (Cameroun, Gabon, Nigeria).
- **Groupe P** (lettre choisie à la suite des groupes M, N et O) : il est le groupe découvert le plus récemment (Plantier et al. 2009) et dont la transmission inter-espèces est la plus récente.

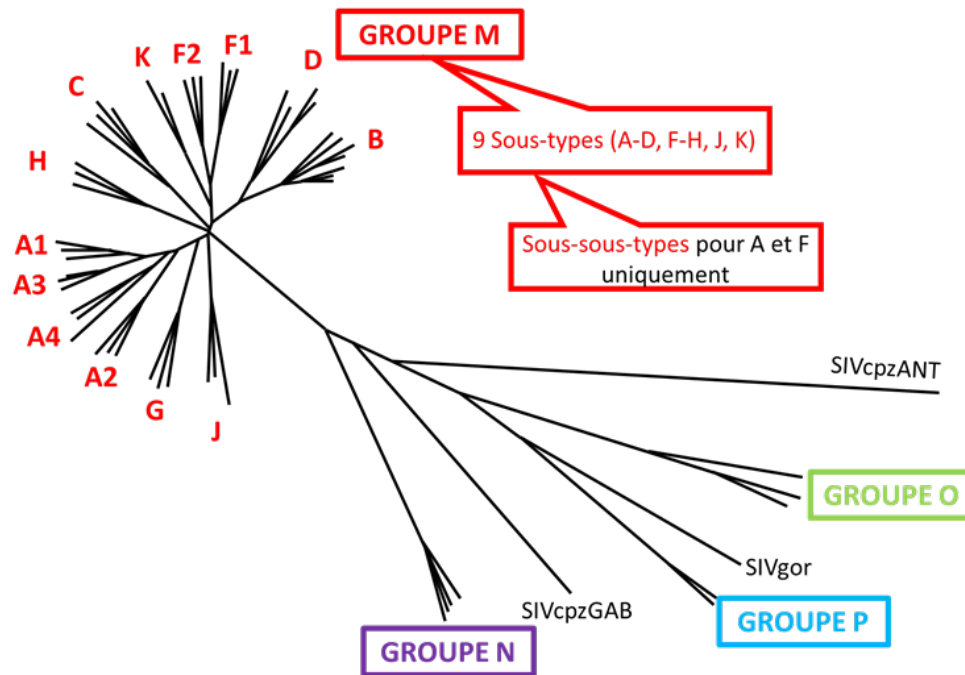


Figure 1 : Phylogénie du VIH-1 (Adapté de (Tebit and Arts 2011)).

c. Dates clés de la recherche sur le VIH-1

Depuis la découverte du VIH par l'équipe française et la confirmation par une équipe américaine que la particule virale découverte par les français est celle qui est à l'origine du sida (Barré-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1984), les connaissances sur ce virus ne cessent d'augmenter et permettent de développer des traitements de plus en plus efficaces.

Plusieurs dates importantes marquent la recherche sur le VIH-1 (**Figure 2**) :

- **Années 1920** : datation approximative de l'origine du VIH dans la région de Kinshasa (Faria et al. 2014).
- **1981** : premières descriptions du syndrome d'immunodéficience acquise par le CDC.
- **1983** : **isolement et découverte du virus de l'immunodéficience humaine** (Barré-Sinoussi et al. 1983).
- **1984** : description du récepteur CD4 (cluster de différenciation 4), indispensable à l'infection par le VIH-1 (Dalglish et al. 1984).
- **1985** : séquençage du génome du virus (Ratner et al. 1985).

- **1986** : mise sur le marché de la première molécule antirétrovirale : l'azidothymidine (AZT), développée à l'origine en 1964 comme anti-cancéreux (Horwitz et al. 1964).
- **1996** :
 - description des deux principaux corécepteurs du virus : CCR5 (*CC-chemokine receptor 5*) (Alkhatib et al. 1996; Choe et al. 1996; Deng et al. 1996) et CXCR4 (*CXC-chemokine receptor 4*) (Feng et al. 1996).
 - première trithérapie antirétrovirale (protocole HAART : *highly active antiretroviral treatment*) associant un inhibiteur de protéase (saquinavir) à deux inhibiteurs nucléosidiques de transcriptase inverse (AZT et zalcitabine) (Collier et al. 1996).
- **2005** : **description des « contrôleurs » du VIH** : HIC (*HIV controllers*), capables de contrôler la réplication du virus en absence de traitement antirétroviral (Lambotte et al. 2005).
- **2009** :
 - **essai vaccinal de phase III RV144**. Cet essai en *prime/boost* ayant inclus plus de 16 000 volontaires sains Thaïlandais a montré une protection de 31 % après 42 mois grâce à la combinaison d'un vecteur viral recombinant canarypox contenant plusieurs gènes du VIH, y compris celui codant l'enveloppe (ALVAC-HIV) et d'une protéine gp120 recombinante (AIDSAX B/E) (Rerks-Ngarm et al. 2009).
 - premier cas de rémission : le patient Berlin. Atteint d'une leucémie, il a reçu une transplantation de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur portant une mutation sur le gène du corécepteur CCR5 (mutation CCR5 Δ 32). Cette suppression de 32 paires de bases rend les cellules résistantes à l'infection par des variants du VIH utilisant ce corécepteur (Simmons et al. 1996). Ce patient, infecté par le VIH-1 depuis 1995, n'est plus sous trithérapie depuis sa transplantation et sa charge virale est restée indétectable. Il est ainsi considéré comme guéri du VIH-1 (Hütter et al. 2009).
- **2013** : description des « contrôleurs post-traitements ». Il s'agit de personnes traitées très précocement après l'infection par le VIH-1 et qui parviennent ensuite

à contrôler la réplication virale après arrêt du traitement antirétroviral (Sáez-Cirión et al. 2013).

- **2019** : deuxième cas de rémission : le patient Londres, qui a également reçu une transplantation de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur portant la mutation CCR5Δ32. Infecté par le VIH-1 depuis 2003, ce patient n'est plus sous traitement antirétroviral et n'a plus montré de signe d'infection (Gupta et al. 2019).

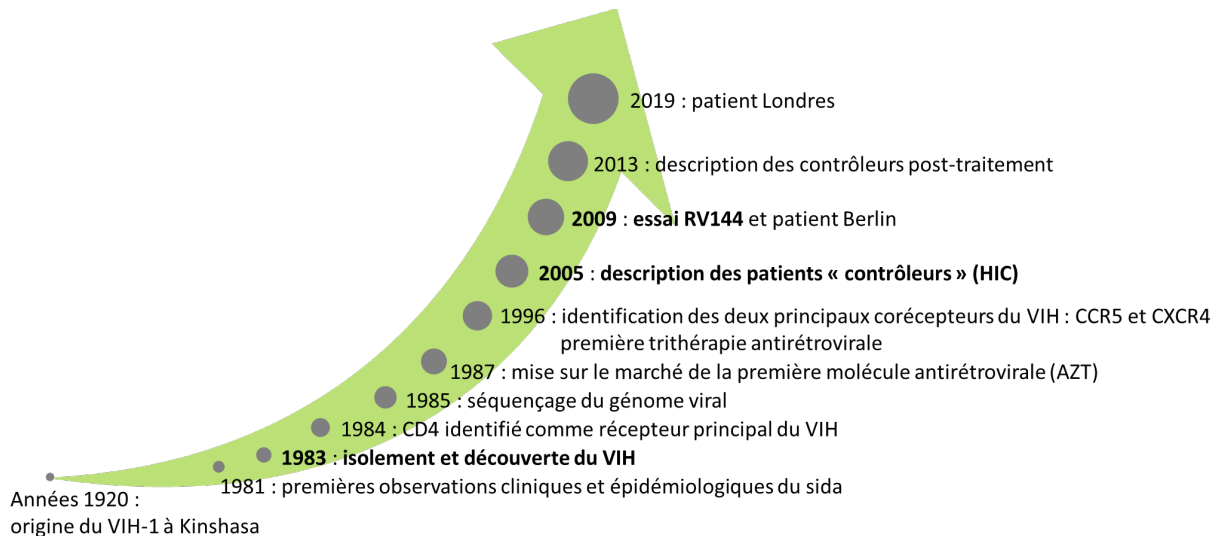


Figure 2 : Dates clés de la recherche sur le VIH-1 (Adapté de (Barré-Sinoussi, Ross, and Delfraissy 2013)).

AZT : azidothymidine, CCR5 : CC-chemokine receptor 5, CXCR4 : CXC-chemokine receptor 4 et HIC : *HIV controllers*.

3. Données épidémiologiques

La dernière estimation du Programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida (ONUSIDA) dénombre 36,9 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2017 (**Figure 3A**). L'Afrique subsaharienne rassemble à elle seule environ 70 % des personnes vivant avec le VIH. Durant l'année 2017, 1,8 millions de personnes ont été infectées par le VIH (**Figure 3B**) et 940 000 décès liés au sida ont été dénombrés (**Figure 3C**).

En ce qui concerne la France, environ 173 000 personnes étaient porteuses du VIH en 2017 dont 24 000 personnes vivant avec le virus sans le savoir. Le nombre de cas d'infection par le VIH diagnostiqués a diminué de 5 % entre 2013 et 2017, passant de 6 325 à environ 6 000. Néanmoins, en 2017/2018, 28 % des personnes diagnostiquées pour une infection à VIH ont

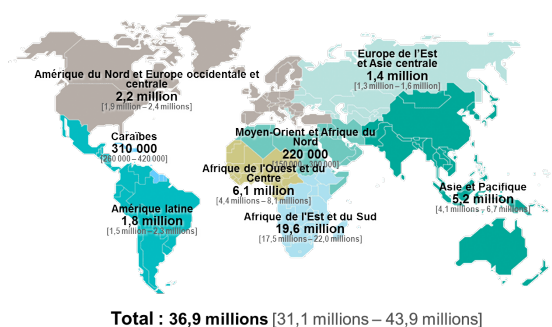
Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

découvert leur séropositivité à un stade avancé et 49 % n'avaient jamais été testées auparavant, soulignant l'importance du dépistage du VIH.

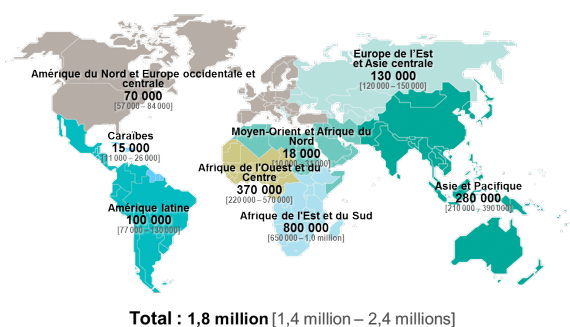
Le Trait d'Union, centre de soins de l'infection par le VIH aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg comptait une file active de 1240 patients en 2016 ("Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union 2016" n.d.). Le nombre de nouvelles infections par le VIH était de 51 au Trait d'Union pour l'année 2016.

La transmission sexuelle du virus représente la majorité de ces nouvelles infections, avec 98 % de transmission par cette voie à l'échelle nationale et 90 % à l'échelle locale du Trait d'Union. Sur les deux types de VIH actuellement décrits, l'infection par le VIH-1 est la plus prévalente à l'échelle nationale alors que l'infection par le VIH-2 est minoritaire (1 % des infections par le VIH) ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.).

A



B



C

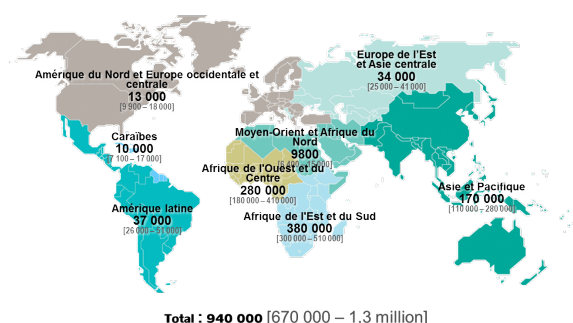


Figure 3 : Répartition mondiale des personnes vivant avec le VIH, des nouvelles infections par le VIH et des décès causés par le VIH en 2017 (“ONUSIDA / UNAIDS,” n.d.).

A : Carte représentant la répartition mondiale des adultes et enfants vivant avec le VIH en 2017.

B : Carte représentant la répartition mondiale des nouvelles infections par le VIH en 2017.

C : Carte représentant la répartition mondiale des décès causés par le VIH en 2017.

Les différentes zones géographiques sont représentées par des couleurs différentes. Les chiffres entre crochets représentent la fourchette des estimations pour chaque zone géographique.

4. Objectifs Horizon-2020

Dans le but de mettre fin à l'épidémie du sida à l'horizon 2020, une cible ambitieuse a été mise en place par l'ONUSIDA en 2014 : 90 % des personnes vivant avec le VIH devront être dépistées, 90 % de celles-ci devront recevoir un traitement antirétroviral durablement et 90 % de ces personnes traitées devront avoir une charge virale indétectable (**Figure 4**) (ONUSIDA 2014, 90). Cet objectif permettrait de multiplier par trois le nombre de personnes vivant avec le VIH ayant une charge virale indétectable et étant donc potentiellement non infectieuses. La modélisation de l'épidémie avec ce but atteint prédit une fin de l'épidémie du sida d'ici à 2030 (ONUSIDA 2014).

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

Les données 2017 de l'ONUSIDA montrent que des progrès remarquables ont été réalisés pour atteindre cet **objectif des 90-90-90 (Figure 4)**. Plus de deux tiers (70 %) des personnes vivant avec le VIH connaissaient leur statut en 2016. Parmi elles, 77 % avaient accès aux traitements antirétroviraux et 82 % d'entre elles avaient supprimé leur charge virale. De plus, plusieurs pays, villes et communautés ont déjà atteint les objectifs 90-90-90.

Cependant, dans de nombreux pays, l'objectif n'est pas encore atteint et ne pourra être réalisable qu'en s'attaquant aux lacunes de la cascade du dépistage et du traitement du VIH. Grâce à des efforts combinés, afin d'améliorer le dépistage et le traitement et venant de tous les acteurs essentiels, l'objectif mondial pourrait être atteint.

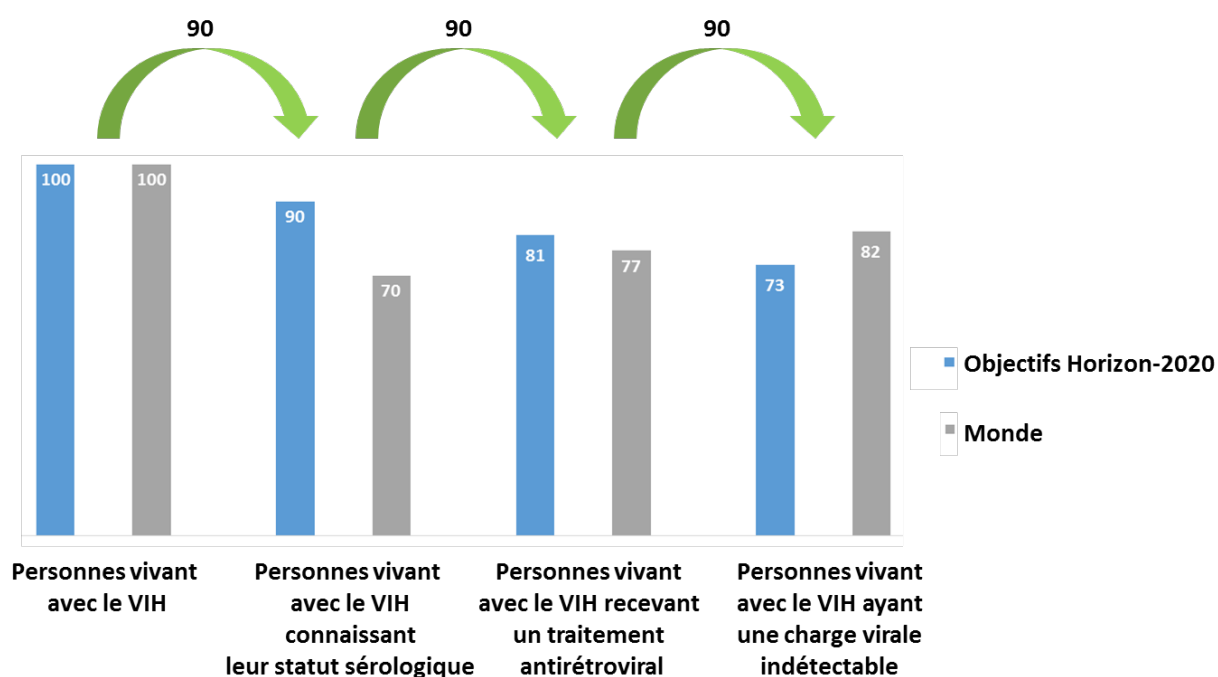


Figure 4 : Cascade de la prise en charge des personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2017, en comparaison de l'objectif Horizon-2020.

Les pourcentages de chaque catégorie sont des estimations en prenant comme 100 % le nombre de personnes vivant avec le VIH-1 (*"En finir avec le sida - Progresser vers les cibles 90-90-90 - Synthèse," n.d.*).

B. Structure et réplication du VIH-1

1. Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 (**Figure 5**) est constitué de deux brins d'ARN simple brin de polarité positive non épissés, d'environ 9,2 kb et reliés par des interactions non covalentes.

Il comprend des régions codant neuf gènes (*gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *rev*, *tat*, *vpu* et *nef*). L'ensemble des gènes est entouré de séquences non codantes LTR (*Long Terminal Repeat*), qui sont indispensables à la réplication du virus.

Le gène ***gag*** code les protéines structurales : la protéine de capside (CA), de matrice (MA) et de nucléocapside (NC) ainsi que p6 et deux petits peptides SP1 et SP2 (*Spacer peptide* 1 et 2). Le gène ***pol*** code trois enzymes : l'intégrase (IN), la transcriptase inverse (RT) et la protéase (PR). Le gène ***env*** code les protéines d'enveloppe : les glycoprotéines de surface (gp120) et transmembranaire (gp41) (Briggs and Kräusslich 2011). Le génome du VIH-1 code également plusieurs protéines régulatrices (Vif, Vpr, Rev, Tat, Vpu et Nef).

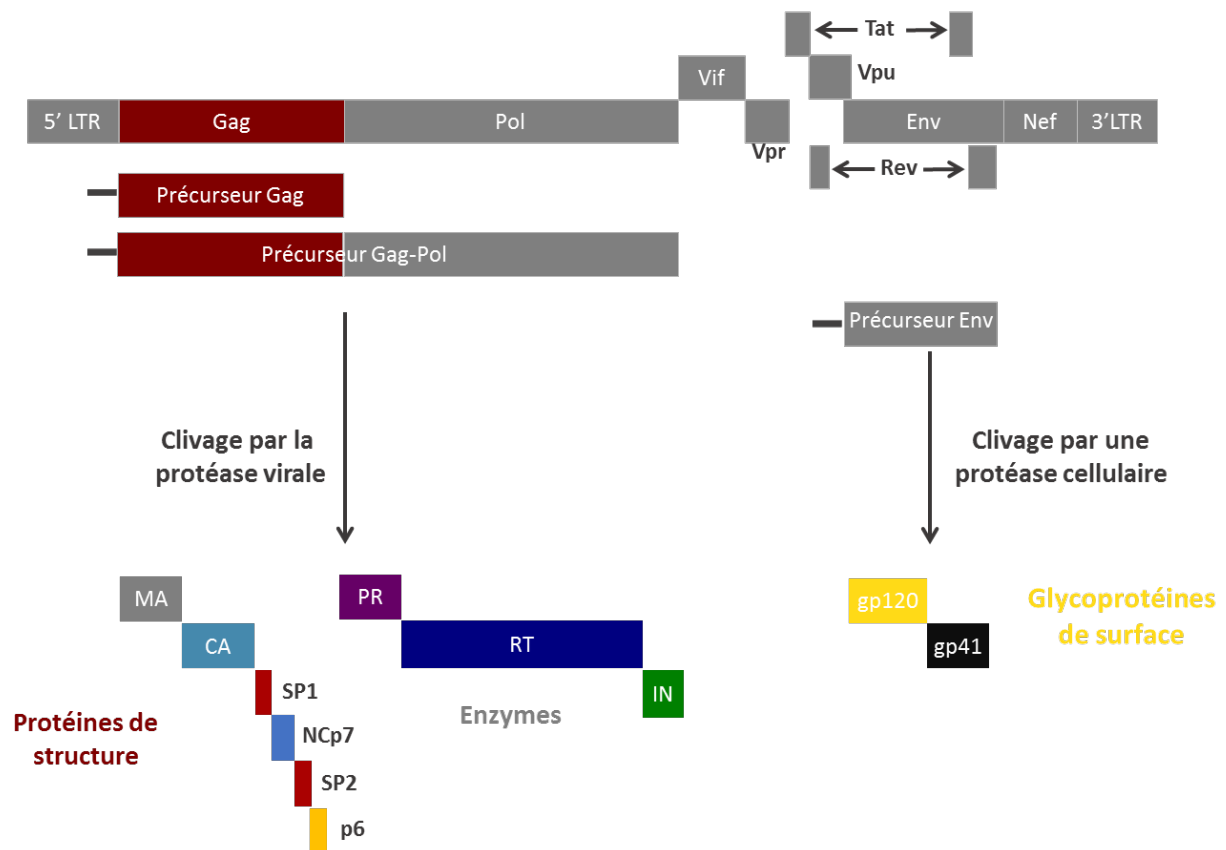


Figure 5 : Organisation du génome du VIH-1 (Adapté de (Mirande 2008)).

Aux deux extrémités de l'ADN proviral de 9 kb se trouvent des séquences non codantes LTR qui sont indispensables à la réplication. Entre ces séquences, se trouvent les gènes codant les précurseurs polyprotéiques qui vont donner naissance aux protéines structurales (Gag), aux enzymes (Pol) ainsi qu'aux glycoprotéines d'enveloppe (Env). Le génome du VIH-1 code aussi plusieurs protéines régulatrices (Vif, Vpr, Rev, Tat, Vpu et Nef).

2. Protéines d'enveloppe du VIH-1

Le gène *env* code une polyprotéine glycosylée gp160 (obtenue par traduction de l'ARN messager viral mono-épissé). Elle est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique puis elle gagne l'appareil de Golgi où elle est clivée par une protéase cellulaire afin de produire les glycoprotéines de surface (gp120) et transmembranaire (gp41) (Moulard and Decroly 2000). Les structures de ces deux glycoprotéines seront détaillées dans les paragraphes suivants.

a. gp120

La glycoprotéine gp120 est composée de 480 acides aminés. Elle est organisée en trimère fortement glycosylé (20 à 35 sites de glycosylation). L'analyse comparative des séquences du gène *env* de plusieurs isolats de VIH-1 a permis d'identifier différentes séquences contenues

dans la sous-unité gp120 et pouvant être ciblées par les anticorps : cinq régions conservées (C1 à C5) et cinq régions hautement variables (V1 à V5) (Starcich et al. 1986). Les séquences variables ont une structure organisée en boucles exposées et reliées entre elles par des ponts disulfures tandis que les régions conservées forment des structures discontinues interagissant avec l'ectodomaine de la gp41 et les récepteurs situés sur la cellule hôte (Checkley, Luttge, and Freed 2011).

L'interaction entre la gp120 et le récepteur CD4 de la cellule cible s'effectue par les séquences conservées C2, C3 et C4 qui forment un cœur enfoui et relativement hydrophobe, constituant le site de fixation au CD4. La structure tertiaire de la gp120 associée au CD4 est schématisée par un domaine interne (*inner domain*) et un domaine externe (*outer domain*) (d'après leur orientation dans le complexe trimérique) reliés par un feuillet intermédiaire (quatre feuillets β antiparallèles) (**Figure 6**). Ces trois domaines participent à l'interaction avec le CD4 (Pantophlet & Burton, 2006). La liaison entre les régions conservées et le CD4 induit un changement conformationnel de la gp120, provoquant le déplacement des boucles V1/V2 et l'exposition de la boucle V3 (glycane) (Kwong et al. 1998). Ce glycane est le principal déterminant impliqué dans la spécificité des corécepteurs CCR5 et CXCR4 (Speck et al. 1997). En effet, la glycosylation d'un site particulier situé sur la boucle V3 définit le tropisme du virus (100 % pour R5 et 36 % pour X4) (M. Zhang et al. 2004).

Le site d'attachement du CD4, les boucles V1/V2 et la boucle V3 contiennent des séquences conservées pouvant être reconnues par les anticorps neutralisants. Cependant, certains de ces épitopes (ou déterminants antigéniques) sont peu accessibles et les anticorps ont donc développé de nombreuses stratégies pour les cibler. Ceci sera détaillé dans le **paragraphe II-B-5 ci-dessous**.

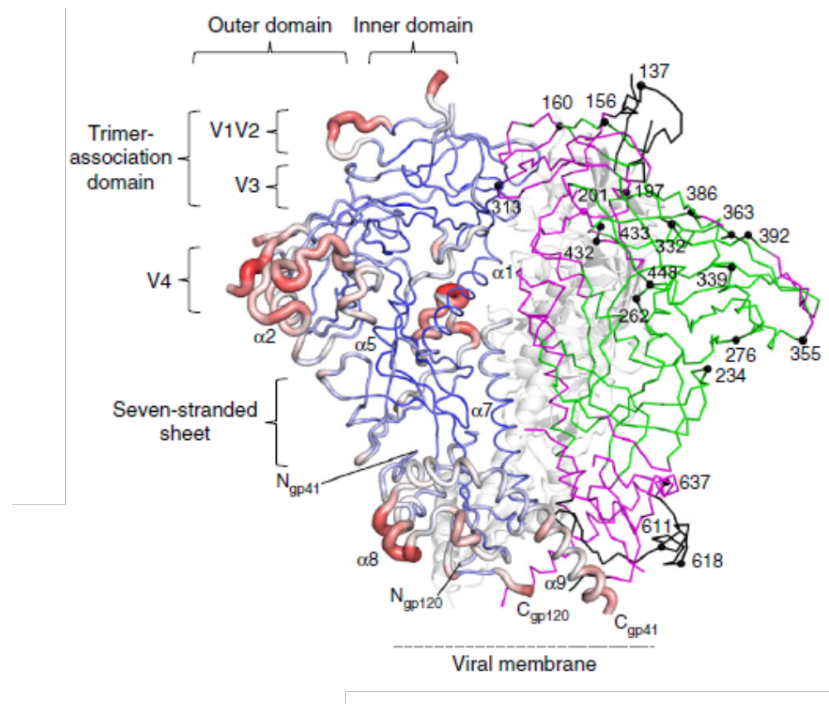


Figure 6 : Structure cristalline du trimère Env du VIH-1 mature (Kwon et al. 2015).

b. gp41

Le réarrangement conformationnel de la gp120 permet de maintenir l'enveloppe proche de la membrane et facilite la fusion médiée par la gp41.

La gp41 est une glycoprotéine transmembranaire fortement glycosylée de 345 acides aminés, beaucoup plus conservée que la gp120, organisée en trois domaines majeurs : le domaine extracellulaire (ou ectodomaine), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. L'ectodomaine contient les domaines impliqués dans la fusion : une région N-terminale hydrophobe appelée peptide de fusion, suivie d'une région polaire, de deux régions hydrophobes en hélices α appelées *N-terminal heptad repeat* (NHR) et *C-terminal heptad repeat* (CHR) formant une structure en faisceau d'hélices, d'une boucle issue d'un pont disulfure connectant les régions NHR et CHR appelée région immunodominante et d'un domaine riche en résidus tryptophane appelé *membrane proximal external region* (MPER) (Montero et al. 2008).

La conformation en super hélice, due au repliement des régions NHR et CHR l'une sur l'autre, représente la conformation active de la gp41 permettant le rapprochement des deux membranes plasmiques ainsi que leur fusion (Checkley, Luttge, and Freed 2011).

3. Particule virale du VIH-1

La particule virale mature du VIH-1 (**Figure 7 A et B**) a une forme sphérique et un diamètre de 100 à 120 nm. Elle provient de l'assemblage et de la maturation des polyprotéines Pr55^{Gag}, Pr160^{Gag-Pol} et Envgp160.

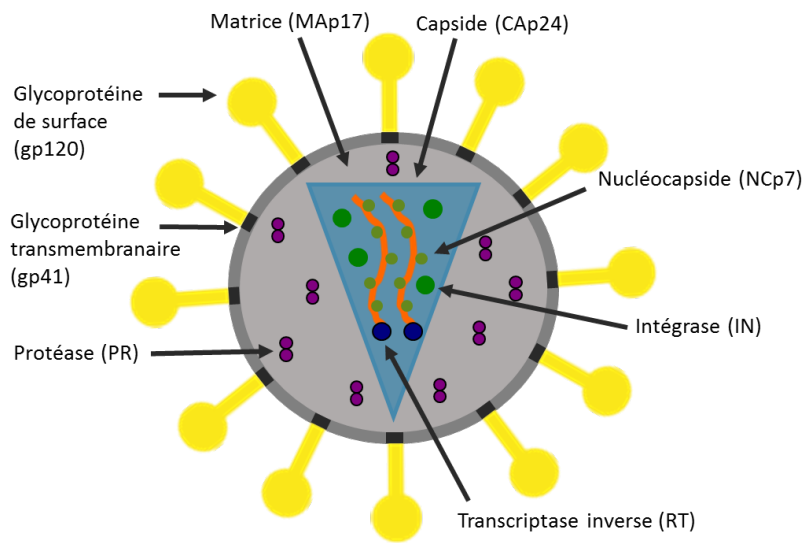
Son enveloppe est une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Elle contient les glycoprotéines virales Env sous forme de polyprotéines exposées à la surface de la particule virale (gp120) ou ancrées dans la membrane (gp41). Ces protéines d'enveloppe possèdent des propriétés spécifiques dites « fusogéniques », permettant la fixation du virus à la membrane plasmique de la cellule cible.

La face interne de l'enveloppe est tapissée par les protéines de matrice (MAp17), qui sont étroitement associées à l'enveloppe lipidique par leur extrémité N-terminale myristoylée.

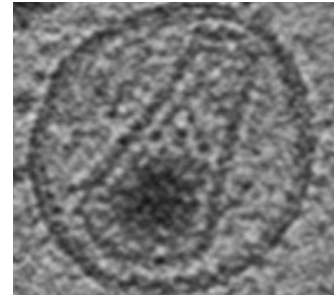
Les protéines de capsid (CAp24) forment le cœur rétroviral. L'assemblage de la protéine p24 en hexamères et en pentamères forme une capsid de forme conique (**Figure 7 A en bleu et B**). Cette capsid contient l'ARN viral sous forme dimérique et associé aux protéines de nucléocapsid (NCp7), permettant une protection contre les nucléases (Coffin, Hughes, and Varmus 1997).

On y retrouve également les enzymes virales (PR, IN et RT), les protéines auxiliaires Vpr, Vif et Nef, ainsi que l'ARN de transfert cellulaire (ARNt^{Lys,3}), servant d'amorce à la transcription inverse. La capsid contient également des protéines cellulaires (cyclophiline A, Staufen...) et des acides nucléiques cellulaires encapsidés (Chertova et al. 2006; Houzet et al. 2007; Santos et al. 2012).

A



B



27

Figure 7 : Particule virale du VIH-1.

A : Structure de la particule virale du VIH-1 (Adapté de (Larrouy, Brun-Vézinet, and Descamps 2010)).

La particule virale est de forme sphérique pour le VIH-1 et a un diamètre de 100 à 120 nm. Son enveloppe est une bicouche lipidique recouverte de glycoprotéines de surface (gp120 et gp41). La paroi interne de l'enveloppe est tapissée par la matrice. La capside de forme conique contient l'ARN viral sous forme diploïde et associé aux protéines de nucléocapside, ainsi que les enzymes et les protéines auxiliaires Vpr, Vif et Nef.

B : Particule virale mature vue en microscopie électronique (Briggs and Kräusslich 2011).

Observation au microscope électronique de la particule virale mature du VIH-1, caractérisée par sa capside de forme conique.

4. Cycle de réplication du VIH-1

Dans les lymphocytes T CD4⁺ activés, la durée du cycle de réplication du VIH-1 est estimée à deux jours (Perelson et al. 1996).

Le cycle de réplication viral (**Figure 8**) se décompose en une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce (**Figure 8 à gauche**) comprend les étapes d'interactions des protéines de surface de la particule virale avec les récepteurs cellulaires, de transcription inverse de l'ARN viral en ADN proviral et d'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule hôte. La phase tardive (**Figure 8 à droite**) concerne quant à elle la transcription et l'expression du génome, ainsi que le bourgeonnement et la maturation de nouvelles particules virales.

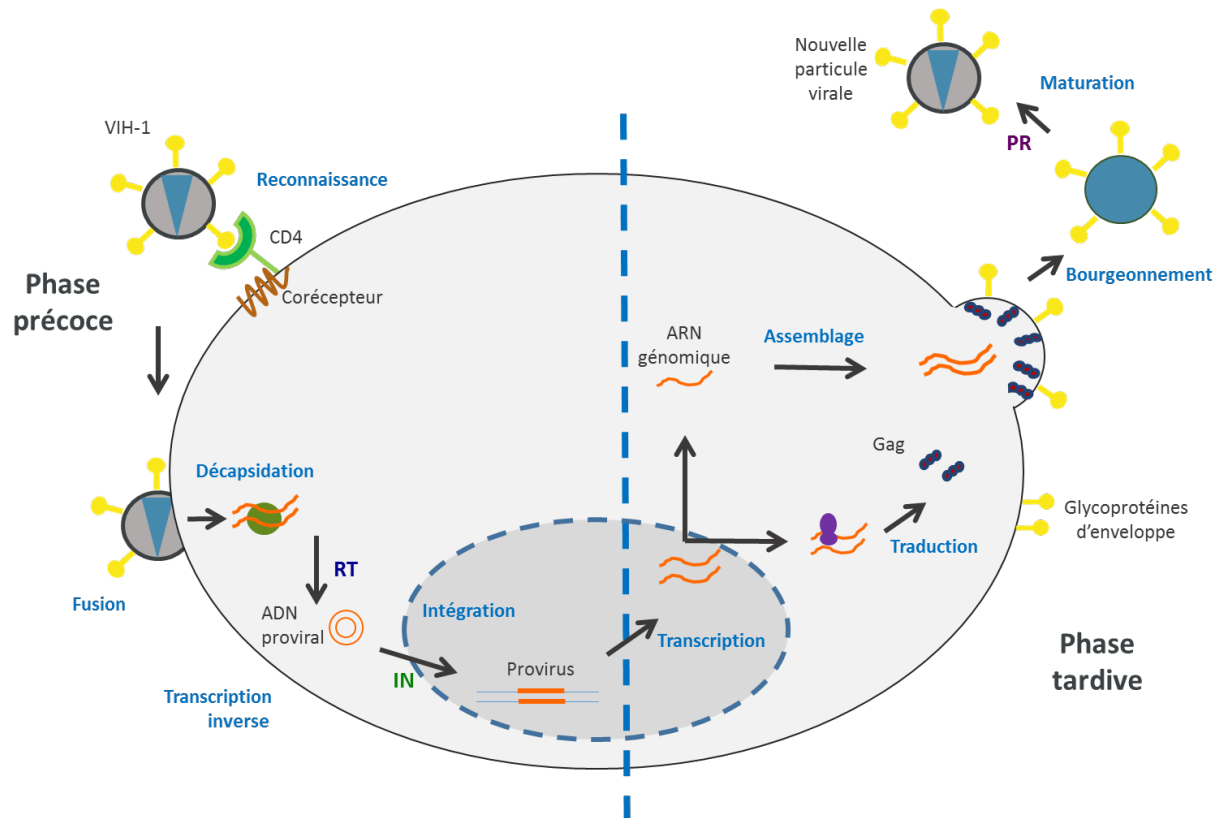


Figure 8 : Schéma simplifié du cycle de réplication du VIH-1 (Adapté de (Bauby, Lopez-Vergès, and Berlioz-Torrent 2008)).

La première étape du cycle viral est la reconnaissance des récepteurs CD4 de la cellule cible ainsi que des corécepteurs CCR5 et CXCR4 par les glycoprotéines gp120 du virus. Ensuite, les membranes virale et cellulaire fusionnent afin de permettre l'entrée du virus. Après libération de la capsid dans le cytoplasme, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN proviral par la transcriptase inverse. L'ADN proviral est ensuite intégré au génome de la cellule hôte par l'intégrase. Dans le noyau, l'ADN est transcrit en ARNm par l'ARN polymérase II. Puis, cet ARNm sera traduit en protéines virales dans le cytoplasme. De nouvelles particules virales seront ensuite assemblées, avant d'être libérées et maturées par la protéase virale.

a. Phase précoce

i. Reconnaissance, fusion et entrée

Les premières étapes du cycle de réplication viral sont la reconnaissance, la fusion et l'entrée du virus dans les cellules cibles. Le VIH est reconnu et se lie à ses cellules cibles grâce à l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe virale gp120 et les récepteurs CD4 présents à la surface de certaines cellules immunitaires (Dalglish et al. 1984; Klatzmann et al. 1984). Cette interaction entraîne un changement de conformation de la gp120, qui lui permet de se lier à un deuxième récepteur présent à côté du CD4 : le corécepteur. Les principaux corécepteurs sont les récepteurs aux chimiokines : CXCR4 et CCR5, qui sont présents sur

différents types cellulaires (voir **paragraphe I-B-5 ci-dessous**). Ces récepteurs déterminent le tropisme viral : les virus reconnaissant le CXCR4 sont désignés virus de type X4 (tropisme X4) et ceux reconnaissant le CCR5 sont des virus de type R5 (tropisme R5). Le VIH-1 peut également utiliser les deux corécepteurs et le virus est alors de type X4R5 ou peut également être qualifié de *dual-tropic*. Certains individus caucasiens présentent une mutation dans le gène codant le CCR5. Cette délétion de 32 paires de base entraîne la formation d'un CCR5 tronqué (CCR5 Δ 32), empêchant ainsi l'infection par les virus de type R5 (Samson et al. 1996). Suite à la fixation de la gp120 à son corécepteur, on observe un réarrangement de la protéine d'enveloppe virale gp41 : le domaine de fusion est libéré, ce qui permet son insertion dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Ceci entraîne la fusion des membranes de la particule virale et de la cellule hôte. Ce phénomène crée un pore de fusion et permet la libération de la capsid dans le cytoplasme cellulaire (Melikyan 2008; Blumenthal, Durell, and Viard 2012). Il existe également une autre forme d'entrée du VIH-1 : la transmission de cellule à cellule, notamment par la formation de synapses virologiques (Jolly and Sattentau 2004). Une étude récente a montré que le VIH-1 est capable d'échapper aux mécanismes de reconnaissance de la réponse immunitaire innée en recrutant une enzyme cellulaire, la FTS3 (responsable de 2-O-méthylation), afin de méthyliser son propre ARN génomique (Ringard et al. 2019). Cette modification est une signature du soi et permet ainsi au virus « camouflé » de poursuivre l'infection en transformant son ARN en ADN.

ii. Transcription inverse

Après fusion des membranes de la particule virale et de la cellule cible, la capsid pénètre dans le cytoplasme, où l'ARN génomique et les protéines encapsidées seront libérés (étape de désassemblage). Toutefois, cette étape de désassemblage reste très controversée et plusieurs hypothèses ont été émises : une décapsidation rapide après la fusion, libérant l'ensemble de son contenu dans le cytoplasme, un désassemblage progressif tout au long du transport vers le noyau ou encore une décapsidation au niveau du pore nucléaire (Arhel 2010; Bejarano et al. 2019).

Le génome viral sous sa forme ARN est associé à la transcriptase inverse (RT) ainsi qu'à d'autres protéines (virales et cellulaires) au sein d'un complexe appelé complexe de transcription inverse. L'ARN viral y est rétrotranscrit en un ADN double brin (Hu and Hughes 2012).

La transcriptase inverse est toutefois responsable d'erreurs fréquentes, étant à l'origine de la variabilité génétique du VIH et contribuant aux résistances aux traitements antirétroviraux (Charpentier et al. 2006; Nora et al. 2007).

Le facteur de restriction cellulaire SAMHD1 est capable de bloquer la transcription virale en hydrolysant les dNTP (les quatre désoxyribonucléotides), indispensables à la synthèse d'ADN (Lahouassa et al. 2012). L'action de SAMHD1 est contrecarrée par la protéine virale Vpx, présente uniquement chez le VIH-2 et le SIV (Hrecka et al. 2011; Laguette et al. 2011).

iii. Intégration au génome de la cellule cible

Après la transcription inverse, le complexe de transcription inverse est réorganisé en complexe de pré-intégration (PIC). Ce complexe est principalement composé de l'ADN viral double brin linéaire ainsi que de la protéine de capsid (CA) et de l'intégrase (IN). La présence des protéines de matrice, de nucléocapside, de la transcriptase inverse et de Vpr dans le PIC est très controversée (Farnet and Haseltine 1991; Bukrinsky et al. 1993; Miller, Farnet, and Bushman 1997).

L'intégrase est la protéine virale responsable et suffisante pour catalyser la réaction d'intégration. La localisation de cette intégration n'est pas aléatoire mais cible préférentiellement les sites de transcription active, principalement dans des régions très proches des pores nucléaires (Berry et al. 2006; Marini et al. 2015; Schröder et al. 2002). L'intégrase clive quelques nucléotides aux deux extrémités 3' de l'ADN et intègre l'ADN viral linéaire dans le génome de la cellule hôte. L'ADN viral intégré porte le nom de provirus. Le provirus peut rester silencieux par le biais de différents mécanismes pendant plusieurs années, créant la phase de latence (Nisole and Saïb 2004). Lors d'une infection productive, l'ADN proviral est transcrit en ARN messager (ARNm) (voir **paragraphe I-B-4-b ci-dessous**).

b. Phase tardive

i. Transcription de l'ADN proviral

Les protéines virales Tat et Nef détournent la machinerie cellulaire transcriptionnelle afin de synthétiser des ARNm à partir de l'ADN proviral intégré (Karn and Stoltzfus 2012). La protéine Tat permet par exemple le recrutement de facteurs facilitant l'élongation tels que les histones acétyltransférases ainsi que le complexe *positive transcription elongation factor b* (p-TEFB). La

protéine Rev recrute quant à elle des protéines cellulaires afin d'exporter les ARNm viraux non épissés dans le cytoplasme (Rausch and Le Grice 2015).

ii. Traduction des ARN messagers

Les ARNm viraux sont traduits en précurseurs dans différents compartiments cellulaires. Les ARNm de Gag, Gag-Pol, Vif, Vpr, Nef, Tat et Rev sont traduits en polysomes cytosoliques (Sundquist and Kräusslich 2012). Dans le cytoplasme, la forme mature de Vpr interagit avec des protéines cellulaires afin d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Laguette et al. 2014; Rice and Kimata 2015). La protéine Vif entraîne la dégradation protéasomale du facteur de restriction cellulaire APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) (Rose et al. 2004), limitant son incorporation dans les virions et permettant alors de contrer son action (Henriet et al. 2009; Mariani et al. 2003; Marin et al. 2003). En effet, APOBEC3G est une cytidine déaminase mutant les cytosines en uraciles dans l'ADN produit lors de la transcription inverse, ce qui entraîne des mis-appariements qui sont détectés et détruits par des systèmes de réparation de l'ADN inhibant la synthèse du provirus (Mangeat et al. 2003; H. Zhang et al. 2003). La protéine Nef est quant à elle principalement impliquée dans la régulation de la machinerie de signalisation cellulaire et interagit avec diverses protéines cellulaires, promouvant ainsi la réplication du virus et facilitant l'évasion immunitaire (Foster and Garcia 2008; Saxena, Vekariya, and Tripathi 2019).

Dans le réticulum endoplasmique, l'ARNm de Vpu est traduit et les protéines Vpu matures interagissent avec le CD4 nouvellement synthétisé et le retiennent (Magadán and Bonifacino 2012). Le CD4 est ensuite dégradé par la voie lysosomale ou la voie du protéasome (N. Van Damme and Guatelli 2008; Magadán and Bonifacino 2012). De même, Vpu cible un autre facteur de restriction, la tétherine (CD317, empêche la diffusion des particules virales après le bourgeonnement), qui est dégradée de la même manière que le CD4 (Iwabu et al. 2009). La synthèse et la maturation du précurseur protéique Env se font dans le réticulum endoplasmique (Haim, Salas, and Sodroski 2013). Dans l'appareil de Golgi, les protéases cellulaires clivent le précurseur en protéines gp120 et gp41, qui sont assemblées de façon non covalente en hétérodimère (Wyatt and Sodroski 1998).

Les protéines Env, Vpr, Tat et Nef sont apportées à la membrane cellulaire via la voie sécrétoire (Sundquist and Kräusslich 2012). Cependant, peu de protéines Env parviennent à la membrane cellulaire, à cause d'un taux important de dégradation dans le réticulum

endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi (Santos da Silva, Mulinge, and Perez Bercoff 2013).

iii. Assemblage et bourgeonnement

Les nouvelles particules virales sont assemblées à partir de deux copies d'ARN génomique viral, des protéines virales (Gag, Gag-Pol, Env, Vif, Vpr et Nef) et de cofacteurs cellulaires (Sundquist and Kräusslich 2012). Les particules virales s'assemblent et quittent la cellule par bourgeonnement (Sundquist and Kräusslich 2012). Nef induit la dégradation du CD4 pour empêcher l'interaction Env/CD4 à la surface de la particule virale (Foster and Garcia 2008).

Les particules virales peuvent aussi quitter la cellule par les voies de l'exocytose (Wu and KewalRamani 2006).

iv. Maturation de la particule virale

Les particules virales ayant bourgeonnées à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte subissent ensuite une étape de maturation. Cette maturation est réalisée par la protéase virale clivant les précurseurs Gag et Gag-Pol de façon séquentielle en protéines structurales (matrice, capsid, nucléocapsid et p6) et non-structurales (protéase, transcriptase inverse et intégrase). Ce clivage protéolytique constitue une étape critique permettant le réarrangement de la capsid en forme conique. La maturation constitue la dernière étape du cycle de réplication du VIH-1 et est indispensable à la production de virus infectieux (Sundquist and Kräusslich 2012; Bell and Lever 2013).

5. Cellules cibles du VIH-1

La capacité du VIH-1 à infecter une cellule cible dépend de l'état d'activation de celle-ci, du niveau d'expression des récepteurs et des corécepteurs d'entrée du VIH-1, ainsi que du tropisme de la souche virale. En effet, la protéine gp120 de la particule virale du VIH-1 reconnaît le récepteur CD4 ainsi qu'un corécepteur : CCR5 et/ou CXCR4, présents à la surface de la cellule immunitaire cible (voir **paragraphe I-B-4-a-i ci-dessus**) (Wilén, Tilton, and Doms 2012; Melikyan 2014).

Ainsi, les cellules cibles du VIH-1 expriment à la fois le récepteur CD4 et un corécepteur. Différents types cellulaires sont donc ciblés par ce virus (**Figure 9**) (Barton, Winckelmann, and Palmer 2016) :

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

- les lymphocytes T CD4⁺ (CD4⁺, CCR5⁺, CXCR4⁺).
- les monocytes/macrophages (CD4⁺, CCR5⁺).
- les cellules dendritiques (CD4⁺, CCR5⁺, CXCR4⁺).
- les cellules microgliales (CD4⁺, CCR5⁺).
- les astrocytes (CCR5⁺, CXCR4⁺).
- les cellules *natural killer* (NK) (CD4⁺, CCR5⁺, CXCR4⁺).

Les principales cellules cibles du VIH-1 sont les lymphocytes T CD4⁺ ainsi que les monocytes/macrophages (Barton, Winckelmann, and Palmer 2016). Ces cellules sont présentes dans tout l'organisme (**Figure 9**). Différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ existent et expriment plus ou moins les récepteurs et corécepteurs du VIH-1 à leur surface. Ainsi, les niveaux d'infection de ces cellules sont variables en fonction des sous-populations (Lee and Lichterfeld 2016). Les lymphocytes Th17, dont la localisation principale se situe au niveau du tractus digestif, sont particulièrement touchés par l'infection par le VIH-1 (Prendergast et al. 2010). De même, les lymphocytes Th22 sont des cibles privilégiées du VIH (Kim et al. 2012).

Les cellules folliculaires dendritiques sont également sensibles à l'infection par le VIH-1 et sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques. Dans le système nerveux central, les cellules microgliales co-exprimant le CD4 et CCR5 sont également le siège d'une multiplication virale locale. L'infection des astrocytes par le VIH-1 est controversée (Liu et al. 2004; Boutet et al. 2001). En effet, ces cellules n'expriment pas le récepteur CD4. Ainsi, des mécanismes d'entrée du virus n'utilisant pas le CD4 sont envisagés tels que l'utilisation de la protéine hMR (*human mannose receptor*) (Liu et al. 2004).

On peut également noter que les cellules dendritiques expriment une lectine de type C appelée DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing-non-integrin*), qui permet de reconnaître le VIH-1 par la protéine d'enveloppe gp120 et de l'internaliser (Geijtenbeek et al. 2000). De plus, les cellules de Langherans, qui sont des cellules dendritiques principalement retrouvées dans les épithéliums pluristratifiés, ont été proposées comme étant les premières cibles du VIH-1 (de Witte, Nabatov, and Geijtenbeek 2008; Ribeiro et al. 2016). Elles seraient ainsi capables de capturer et transmettre le VIH-1 aux lymphocytes avoisinants dans les muqueuses.

Une sous-population de cellules NK exprime le récepteur CD4 ainsi que les corécepteurs CCR5 et CXCR4 et est donc susceptible d'être infectée par le VIH-1 (Valentin and Pavlakis 2003; Bernstein et al. 2009).

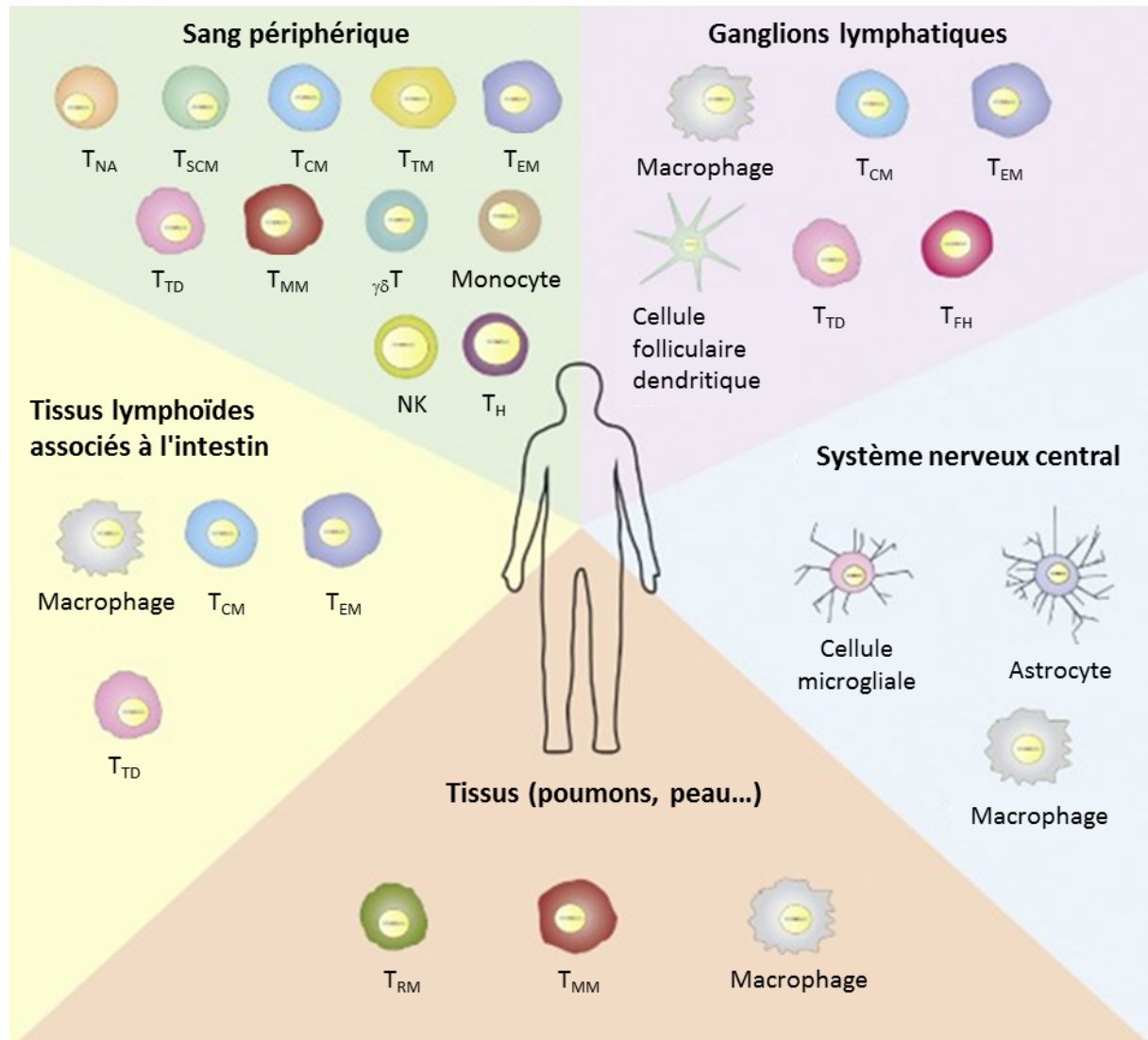


Figure 9 : Cellules cibles du VIH-1 et distribution anatomique (Adapté de (Barton, Winkelmann, and Palmer 2016)).

Les principales cellules cibles du VIH-1 sont les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, retrouvés dans différents compartiments anatomiques. Les cellules *natural killer* (NK), les cellules folliculaires dendritiques, les cellules microgliales et les astrocytes peuvent également être infectés par le VIH-1.

C. Prévention et traitements contre l'infection par le VIH-1

1. Dépistage

L'ONUSIDA a fixé une cible ambitieuse pour 2020 : l'objectif 90-90-90 (**Figure 4**). Pour que cet objectif soit atteint, un effort important doit être fait au niveau du dépistage des personnes vivant avec le VIH. On estime en effet que seulement 70 % des personnes infectées par le VIH-1 sont au courant de leur séropositivité au niveau mondial. Il est à noter que de gros progrès ont été faits dans le cadre de l'objectif Horizon-2020. En effet, plusieurs pays à revenu élevé et certaines villes ont déjà atteint l'objectif 90-90-90. Les données les plus récentes montrent que 42 pays localisés dans plusieurs régions et dans différents contextes épidémiologiques ont atteint un ou plusieurs des 90, sept ont atteint l'objectif et 11 sont sur le point de l'atteindre, ce qui se traduit par 73 % de l'ensemble des personnes vivant avec le VIH qui ont une charge virale supprimée ("En finir avec le sida - Progresser vers les cibles 90-90-90 - Synthèse," n.d.).

Cependant, l'accès aux différents tests de dépistage reste limité dans certains pays : d'abord à cause de leur coût mais aussi à cause du manque de matériel nécessaire aux analyses. En France, le dépistage est uniquement obligatoire lors de dons de sang, d'organes ou de tissus.

Il existe trois catégories de tests de dépistage du VIH ("Testing | HIV Basics | HIV/AIDS | CDC" 2017) :

- **Test de détection des anticorps** : actuellement, la plupart des tests utilisés sont de cette catégorie. Ils permettent de détecter des anticorps produits par le système immunitaire en réponse à l'infection virale. On ne peut donc pas les utiliser immédiatement après une exposition à un risque. En effet, plusieurs semaines (de trois à douze selon les individus) sont nécessaires à l'organisme pour produire une quantité d'anticorps suffisamment élevée pour être détectable. Ces tests permettent un diagnostic en quelques minutes par prélèvement de sang ou de salive. Cette méthode est généralement celle utilisée dans les autotests (mis sur le marché français en mars 2015) qui permettent de fournir un résultat fiable (> 99 % pour le test Mylan® commercialisé en France) sur le statut sérologique d'un

individu. En cas de résultat positif, ces tests doivent être confirmés par des tests couplant la détection des anticorps et des antigènes viraux.

- **Test de détection couplée des anticorps et des antigènes** : ils sont aussi appelés tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) combinés ou tests de quatrième génération et sont généralement ceux utilisés pour valider un résultat de séroposivité. Ils permettent la détection couplée des anticorps dirigés contre le VIH-1 ainsi que de l'antigène p24 (correspondant au domaine capsidique de la protéine Gag ou à la protéine de capsidique mature). Un résultat négatif de ce test effectué six semaines après l'exposition supposée est considéré comme démontrant l'absence d'infection par le VIH (selon un rapport de la Haute Autorité de Santé publié en octobre 2008 : « Dépistage de l'infection par le VIH en France »). En cas de résultat positif, ou de doute sur le résultat (négatif alors qu'il y a eu exposition à un risque), un second test de quatrième génération sera réalisé quelques semaines plus tard pour confirmer le diagnostic. Un test de détection des acides nucléiques pourra aussi être réalisé.
- **Test de détection des acides nucléiques** : ce test permet la mesure directe de la quantité de virus présente dans le sang. Il permet de quantifier l'ARN viral par utilisation de la technique RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) quantitative. Ce test est assez coûteux et ne peut pas être utilisé pour le dépistage systématique. Cependant, il permet de détecter des personnes en primo-infection. En effet, quelques jours après l'infection, la quantité de virus est déjà supérieure au seuil de détection du test.

2. Prévention

Afin d'éviter d'être contaminé ou de contaminer quelqu'un, plusieurs stratégies de prévention sont mises en place : utilisation du préservatif, dépistages réguliers du VIH mais également des autres infections sexuellement transmissibles, traitement prophylactique ou encore recours aux traitements antirétroviraux comme outils de prévention.

En France, pour pallier l'absence d'utilisation du préservatif dans les populations clés (hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes, travailleurs du sexe, usagers de drogues, personnes originaires de région à forte prévalence, personnes ayant des partenaires multiples...), le Truvada® (association en un comprimé d'Emtricitabine et de Ténofovir, respectivement inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse) a récemment été autorisé à titre prophylactique. La PrEP (prophylaxie préexposition) est ainsi recommandée pour certaines populations-clés de l'épidémie à VIH depuis 2015 et est remboursée depuis janvier 2016. Le Truvada® peut être prescrit par un médecin spécialiste et a reçu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en mars 2017.

3. Les microbicides

Les microbicides ont été proposés comme outil de prévention lors de la transmission par voie sexuelle de divers pathogènes. Ces microbicides ont une action directe au niveau de la voie d'entrée du VIH-1 dans les muqueuses. Ils se présentent sous forme de gel, de crème, de suppositoires ou d'anneaux vaginaux. Dans le cas du VIH-1, le premier essai des microbicides contenant le surfactant nonoxynol-9 (N9) s'est révélé être un échec total, avec une augmentation de 300 % du risque d'infection par le VIH-1. Des applications répétées de N9 induisaient une inflammation locale, un changement de la microflore bactérienne et des irritations favorisant l'infection par le VIH-1 (L. Van Damme et al. 2002; Beer et al. 2006).

Une nouvelle classe de microbicides contenant des polyanions a vu le jour. Ces polyanions se lient aux protéines virales cationiques comme la gp120 et empêchent ainsi l'entrée du virus dans sa cellule cible. Parmi ces microbicides, le PRO2000 a montré une efficacité protectrice dans le modèle animal. Cependant cette protection n'a pas été retrouvée chez les femmes (McCormack et al. 2010).

Des microbicides contenant des antirétroviraux ont également été développés. L'utilisation d'un gel vaginal contenant 1 % de Ténofovir, un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, dans l'essai clinique de phase II CAPRISA 004 a ainsi permis une protection de 39 % contre le risque d'infection par le VIH-1. Cet essai démontre que les antirétroviraux ont des propriétés microbicides efficaces dans la protection contre le VIH-1. Cependant l'application de ce gel dans l'essai VOICE, sur des femmes d'origine africaine, s'est révélée inefficace (Klatt et al. 2017). Cette divergence de résultats peut être expliquée par la diversité des flores

microbiennes entre les différentes ethnies. Afin d'obtenir une efficacité protectrice des microbicides au niveau des muqueuses, la prise en compte des différents facteurs endogènes contenus dans le tractus génital féminin devra être prise en compte. Des études ont également montré que des anneaux vaginaux permettant un relargage prolongé de dapivirine diminuent le risque d'infection chez les femmes (Nel et al. 2016).

4. Thérapie antirétrovirale

Les traitements antirétroviraux ont considérablement modifié le pronostic de l'infection par le VIH. Ces associations de molécules antirétrovirales présentant différents mécanismes d'action ciblent la réplication virale active et permettent de la stopper. La mesure d'une quantité d'ARN génomique viral inférieure au seuil de 50 copies/mL dans le plasma sanguin est synonyme d'efficacité du traitement et est définie comme un succès virologique. Un succès virologique prolongé permet une restauration des fonctions immunitaires, une diminution de l'inflammation et ainsi une quasi-normalisation de l'espérance de vie.

Cependant, il est à noter que les thérapies antirétrovirales actuelles ne permettent pas l'éradication du virus de l'organisme car ils n'éliminent pas complètement le réservoir viral (virus à l'état latent, voir **paragraphe I-D-3 ci-dessous**).

a. Objectifs du traitement antirétroviral

Les objectifs du traitement antirétroviral sont multiples et découlent les uns des autres ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.) :

- Diminuer la réplication virale et donc la charge virale plasmatique, laquelle correspond au nombre de copies d'ARN-VIH présents dans le plasma quantifié par RT-PCR. La charge virale plasmatique reflète le nombre de particules virales présentes dans l'organisme. L'objectif est que cette charge virale passe en-dessous du seuil de détection des techniques actuellement commercialisées (entre 20 et 50 copies/mL).
- Empêcher la survenue précoce de maladies à composante inflammatoire comme par exemple les maladies cardiovasculaires, en diminuant l'activation immunitaire généralisée.
- Prévenir au maximum l'apparition de résistance aux antirétroviraux.
- Avoir la meilleure tolérance possible, à court, moyen et long termes.

- Améliorer ou préserver la qualité de vie du patient.
- A une échelle communautaire, empêcher la transmission du virus (*treatment as prevention* ou TasP).

b. Quand débuter un traitement antirétroviral ?

Selon les nouvelles recommandations de prise en charge de 2013, toutes les personnes vivant avec le VIH doivent être traitées, quel que soit leur taux de lymphocytes T CD4⁺, y compris s'il est supérieur à 500 /mm³ ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.).

39

c. Traitement recommandé

Le traitement recommandé est la multi-thérapie (HAART : *highly active antiretroviral treatment*), se composant d'une association de plusieurs molécules ayant des cibles différentes au niveau du cycle de réplication du VIH.

Il existe donc plusieurs classes d'antirétroviraux : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), les inhibiteurs de protéase (IP), un inhibiteur de fusion (IF), un inhibiteur d'entrée du virus (IE) et deux inhibiteurs de l'intégrase (II).

Chaque traitement est individualisé mais la trithérapie de première intention comprend généralement un INNTI associé à deux INTI ou alors un IP couplé au ritonavir (inhibiteur du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), booster d'IP) associé à deux INTI ("HIV/AIDS Treatment Guidelines" n.d.).

d. Mécanisme d'action des différentes classes thérapeutiques

Les antirétroviraux sont des médicaments qui agissent directement contre différents éléments propres au virus. La difficulté rencontrée dans l'élaboration de ces molécules est du même type que celle rencontrée pour les médicaments du domaine de l'oncologie : la spécificité est liée au fait que les rétrovirus ne possèdent que très peu de molécules qui leur sont propres, puisqu'ils détournent la machinerie cellulaire.

Les mécanismes d'action des antirétroviraux sont différents selon leurs classes thérapeutiques (Figure 10) :

- **Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI).** Ce sont des analogues structuraux des nucléosides naturels. Ils sont constitués d'une base pyrimidine ou purine associée au ribose. Différentes molécules existent : Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC), Stavudine (d4T), Abacavir (ABC), Didanosine (ddI), Emtricitabine (FTC) et le Ténofovir sous forme disoproxil fumarate (TDF) ou alafénamide (TAF), qui est un inhibiteur nucléotidique. Les INTI sont administrés sous forme de prodrogues non-phosphorylées, à l'exception du Ténofovir qui est monophosphorylé. Après un passage intracellulaire, les INTI sont phosphorylés en nucléotides triphosphates grâce aux kinases cellulaires. Sous cette forme triphosphate, ils inhibent l'action de la transcriptase inverse par inhibition de l'élongation de l'ADN viral et par leurs propriétés terminatrices de chaînes. Les INTI entrent donc en compétition avec les nucléotides cellulaires. Ils bloquent ainsi la fabrication d'ADN viral. Ce sont donc des inhibiteurs d'une phase précoce du cycle du VIH-1.
- **Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI).** Ce sont des inhibiteurs non-compétitifs, directement actifs dans la cellule. Ces molécules sont actives uniquement sur le VIH-1 (et non sur le VIH-2). La classe des INNTI compte des inhibiteurs de première génération : la Névirapine (NVP) et l'Efavirenz (EFV) ainsi que des inhibiteurs de seconde génération : la Rilpivirine (RPV) et l'Etravirine (ETR). Leur action se fait par liaison directe à la transcriptase inverse dans une poche hydrophobe à proximité du site actif de l'enzyme, ce qui entraîne un effet allostérique qui rend l'enzyme inactive. La fixation d'un INNTI hors du site catalytique induit un changement conformationnel de la transcriptase inverse conduisant au déplacement des résidus aspartates catalytiques, bloquant ainsi l'étape chimique de polymérisation. En tant qu'inhibiteurs allostériques non compétitifs, ils ne modifient pas l'affinité de la transcriptase inverse pour les nucléotides cellulaires ni pour les INTI. Les molécules des deux classes thérapeutiques (INTI et INNTI) ont donc des mécanismes complémentaires

d'inhibition du cycle de réplication du VIH-1 lors d'une étape précoce et peuvent donc être associées.

- **Inhibiteurs de la protéase (IP).** Ce sont des inhibiteurs du site actif de la protéase virale. Ils agissent en perturbant le processus de maturation des nouvelles particules virales. Les nouvelles particules virales ont ainsi une conformation différente des particules virales infectieuses et sont donc non-infectieuses. Ce sont donc des inhibiteurs agissant à une phase tardive du cycle de réplication du VIH-1. En effet, les IP empêchent le clivage des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol en protéines structurales et enzymatiques. La mise au point des IP est basée sur la connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéase virale (PR) et de ses sites de clivage. Les IP commercialisés inhibent le clivage des liaisons peptidiques en se fixant au niveau du site de liaison phénylalanine-proline du substrat de la protéase. On distingue plusieurs inhibiteurs de cette classe thérapeutique : le Saquinavir (SQV), l'Indinavir, le Fosamprenavir (fosAPV), le Lopinavir (LPV), l'Atazanavir (ATV), le Tipranavir (TPV), le Darunavir (DRV). Les molécules les plus récentes (TPV, ATV, DRV) ont été créées afin d'être actives sur les souches virales résistantes aux premiers IP commercialisés. L'association d'un inhibiteur du métabolisme du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) aux IP permet d'augmenter leur biodisponibilité systémique, en réduisant l'effet de premier passage hépatique. Du fait de la faible biodisponibilité des IP, il est en effet nécessaire de booster leur administration par l'adjonction d'une faible dose de Ritonavir (RTV ou /r). Le RTV fut l'un des premiers IP disponibles, puissant inhibiteur du cytochrome P450 3A4, mais présentant une faible activité sur la protéase virale.
- **Inhibiteur de fusion (IF).** Le virus entre dans la cellule cible en deux étapes : il y a d'abord fixation du virus puis fusion des membranes, permettant ensuite le passage de la capside virale. Ceci est possible grâce aux protéines de surface du virus (gp120 et gp41) ainsi qu'aux récepteurs CD4 et corécepteurs de la cellule hôte. L'Enfuvirtide (T20) est un composé peptidique agissant au niveau de la gp120-gp41 comme faux substrat, inhibant ainsi la fusion du VIH-1 à la cellule hôte.

Le virus reste cependant fixé sur la cellule. Il est à noter qu'il ne reconnaît pas la liaison gp105-gp36 (les protéines de surface équivalentes du VIH-2), il n'est donc pas actif sur le VIH-2. De plus, le T20 est peu stable et doit être administré par injection intra-veineuse, ce qui complique son utilisation.

- **Inhibiteur d'entrée (IE).** L'anti-CCR5 est un inhibiteur de l'entrée du virus, plus précisément, il empêche l'attachement de la particule virale à sa cellule cible. Après la liaison de la gp120 au récepteur CD4 de la cellule hôte, la gp120 subit une modification conformationnelle, rendant accessible une boucle variable de la protéine (boucle V3), permettant la liaison à un corécepteur. Ce corécepteur peut être soit le CCR5 soit le CXCR4 en fonction de la séquence de la boucle V3, c'est ce que l'on appelle le tropisme viral. Le Maraviroc (MVC) est le seul anti-CCR5 commercialisé et se fixe sur le corécepteur CCR5, empêchant ainsi sa reconnaissance par la gp120. Afin de pouvoir utiliser le MVC en clinique, il est donc nécessaire de définir au préalable le tropisme viral du patient. En effet, si celui-ci a un tropisme mixte ou un tropisme pour le corécepteur CXCR4, le MVC n'aura pas de fonction inhibitrice et ne pourra pas donc pas être utilisé.
- **Inhibiteurs de l'intégrase (II).** Ces inhibiteurs bloquent l'étape de transfert de brin d'ADN lors de l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte. Le Raltégravir (RAL), l'Elvitégravir (EVG) et le Dolutégravir (DTG) sont les molécules de la classe thérapeutique antirétrovirale ciblant l'intégrase du VIH, enzyme nécessaire à l'intégration du génome du VIH dans l'ADN cellulaire de l'hôte. Elles appartiennent à la famille des inhibiteurs sélectifs du transfert de brins nucléotidiques et agissent en se fixant sur le complexe de pré-intégration (PIC), constitué notamment de l'intégrase et de l'ADN viral à proximité de l'extrémité 3'. Les II sont actifs indépendamment du tropisme des virus VIH-1 et VIH-2 (CCR5 et CXCR4) et agissent également sur les virus résistants aux autres classes thérapeutiques antirétrovirales.

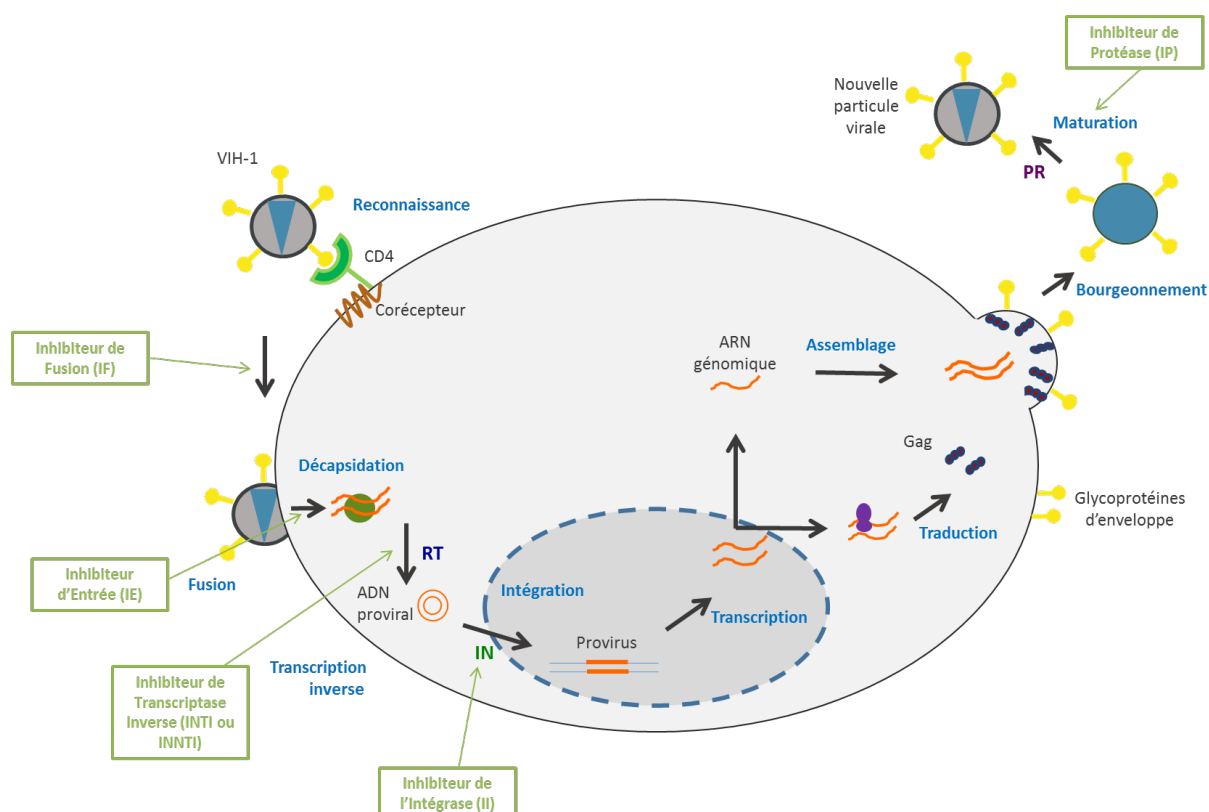


Figure 10 : Cibles des différentes classes thérapeutiques d'antirétroviraux.

Les six classes thérapeutiques d'antirétroviraux (INTI, INNTI, IP, IF, IE, II) ciblent différentes étapes du cycle de réplication du VIH-1.

e. Efficacité immuno-virologique

L'efficacité immuno-virologique est mesurée par deux paramètres : la charge virale, correspondant au nombre de copies de virus VIH dans le sang et, indirectement, par le nombre de lymphocytes T CD4⁺. La réplication virale est contrôlée si la charge virale est indétectable sous traitement antirétroviral (c'est-à-dire si elle est inférieure à la limite de détection de la technique utilisée). L'efficacité immunologique du traitement s'observe quant à elle par la remontée du taux de lymphocytes T CD4⁺ jusqu'à une normalisation avec un nombre supérieur à 500 /mm³.

f. Molécules antirétrovirales commercialisées

Plusieurs molécules antirétrovirales sont actuellement sur le marché en France (**Tableau 1**). Les dénominations communes internationales (DCI), les abréviations et les noms de spécialités de ces molécules ont été listés et classés selon leur classe thérapeutique dans le Tableau 1 ci-dessous.

Classe thérapeutique	DCI	Abréviation	Spécialité
INTI	Abacavir	ABC	Ziagen®
	Emtricitabine	FTC	Emtriva®
	Didanosine	ddI	Videx®
	Lamivudine	3TC	Epivir®
	Zidovudine	AZT	Retrovir®
	Ténofovir disoproxil fumarate	TDF	Viread®
	Ténofovir alafénamide	TAF	/
INNTI	Efavirenz	EFV	Sustiva®
	Etravirine	ETR	Intérence®
	Névirapine	NVP	Viramune®
	Rilpivirine	RPV	Edurant®
IP	Atazanavir	ATV	Reyataz®
	Darunavir	DRV	Prezista®
	Fosamprenavir	fosAMP	Telzir®
	Lopinavir + ritonavir	LPV/r	Lopinavir®
	Saquinavir	SQV	Invirase®
	Tipranavir	TPV	Aptivus®
Booster d'IP	Ritonavir	RTV ou /r	Norvir®
IF	Enfuvirtide	T20	Fuzeon®
IE	Maraviroc	MVC	Celsentri®
II	Raltégravir	RAL	Isentress®
	Elvitégravir	EVG	/
	Dolutégravir	DTG	Tivicay®

Tableau 1 : Molécules antirétrovirales commercialisées en France en 2017 (Adapté de ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.)).

DCI : dénomination commune internationale, INTI : inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, IP : inhibiteurs de protéase, IF : inhibiteur de fusion, IE : inhibiteur d'entrée du virus et II : inhibiteurs de l'intégrase.

g. Combinaisons thérapeutiques

Aujourd'hui, les molécules antirétrovirales présentées ci-dessus (**Tableau 1**) ne sont pas administrées individuellement mais en association, afin d'éviter le développement rapide de virus résistants.

Les associations de plusieurs molécules antirétrovirales (combinant de deux à quatre molécules) les plus actives et commercialisées sous forme combinées ont été listées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**).

DCI	Abréviation	Spécialité
Zidovudine + Lamivudine	AZT/3TC	Combivir®
Zidovudine + Lamivudine + Abacavir	AZT/3TC/ABC	Trivizir®
Abacavir + Lamivudine	ABC/3TC	Kivexa®
Emtricitabine + Ténofovir disoproxil fumarate	FTC/TDF	Truvada®
Emtricitabine + Ténofovir alafénamide	FTC/TAF	Odefsey®
Emtricitabine + Ténofovir disoproxil fumarate + Efavirenz	FTC/TDF/EFV	Atripla®
Emtricitabine + Ténofovir disoproxil fumarate + Rilpivirine	FTC/TDF/RPV	Eviplera®
Abacavir + Lamivudine + Dolutégravir	ABC/3TC/DTG	Triumeq®
Emtricitabine + Ténofovir disoproxil fumarate + Elvitégravir + Cobisistat (inhibiteur CYP34A)	FTC/TDF/EVG/c	Stribild®
Emtricitabine + Ténofovir alafénamide + Elvitégravir + Cobisistat	FTC/TAF/EVG/c	Genvoya®

Tableau 2 : Présentations combinées de molécules antirétrovirales commercialisées en France en 2017 (Adapté de ("Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH," n.d.)).

Ces traitements associant plusieurs molécules antirétrovirales en un comprimé à prendre une fois par jour permettent de faciliter l'observance et la qualité de vie des personnes vivant avec le VIH.

h. Effets indésirables

Les molécules antirétrovirales présentent toutes une toxicité responsable de différents effets indésirables. Ces effets peuvent être bénins ou graves et sont différents selon le moment de leur apparition.

Selon la période d'apparition, on distingue les effets indésirables à court, moyen et long terme.

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH

Les effets indésirables à court terme surviennent entre quelques jours et quelques semaines après le début du traitement et sont la plupart du temps réversibles à l'arrêt du traitement antirétroviral.

D'autres effets indésirables apparaissent à plus longue échéance, comme la lipodystrophie (changements anormaux dans la distribution des graisses dans le corps), et sont difficilement réversibles. La tolérance des médicaments antirétroviraux a été cependant considérablement améliorée par la mise sur le marché de nouvelles molécules (Kanters et al. 2017).

46

Les effets indésirables les plus fréquents à court terme sont principalement des atteintes cutanées, une toxicité hématologique, des troubles digestifs, des effets neuropsychiques, une hépatotoxicité et une néphrotoxicité.

Les effets à moyen terme, comme la toxicité mitochondriale des premiers INTI avec la lipodystrophie, ou à long terme, comme les troubles métaboliques, sont, eux, le plus souvent permanents. Les facteurs de risques cardiovasculaires, ayant plusieurs étiologies, sont responsables de la morbidité et de la mortalité chez les patients en succès virologique.

D. Caractéristiques biologiques et cliniques du VIH-1

1. Modes de transmission

Le VIH-1 est présent dans la plupart des liquides biologiques de l'organisme (sang, sperme, liquide séminal, sécrétions vaginales et lait maternel) à des concentrations différentes. La transmission du virus d'un individu à un autre se fait donc par l'échange de ces liquides biologiques.

Il existe trois modes de transmission du VIH-1 :

- **Voie sexuelle** : il s'agit de la voie majoritaire de transmission. Le virus pénètre au travers des muqueuses vaginales, buccales ou anales. Le risque de contamination augmente fortement si des lésions sont présentes au niveau de ces muqueuses, ou s'il y a présence d'autres maladies sexuellement transmissibles. L'utilisation du préservatif reste le meilleur moyen de limiter l'infection par ce type de transmission. Un traitement prophylactique, le Truvada® (PrEP : prophylaxie

préexposition) a récemment été autorisé à la commercialisation en France afin de cibler les populations clés pouvant être réfractaires à l'utilisation du préservatif (essai ANRS (Agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales) Ipergay).

- **Voie sanguine** : cette voie a été démontrée comme étant une voie de transmission du VIH-1 rapidement après la découverte du virus. En effet, de nombreuses personnes ont été infectées suite à une transfusion sanguine ou à une transplantation. De nos jours, ce risque est presque nul en France mais existe encore dans les pays où le sang n'est pas systématiquement testé lors du don. Aujourd'hui, ce mode de transmission persiste principalement chez les toxicomanes (injection de drogues par voie intraveineuse) ou chez le personnel de santé ou de recherche (blessure par un objet souillé).
- **Transmission mère – enfant** : cette transmission dite verticale se produit principalement pendant l'accouchement mais aussi pendant la grossesse ou l'allaitement. Ce risque reste très faible en France grâce à un accompagnement adapté.

La transmission du VIH se fait essentiellement par un virus de type CCR5 (c'est-à-dire utilisant le corécepteur CCR5), restant prédominant dans les phases initiales de l'infection (Keele et al. 2006; Rowland-Jones 2003). Puis, au fur et à mesure des années post-infection, on détecte des virus capables d'utiliser le corécepteur CXCR4 ou ayant un double tropisme. Ceci se produit de manière concomitante à la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et à l'apparition des signes cliniques. Pourtant, de nombreuses souches virales circulantes sont retrouvées rapidement après l'infection, du fait de la réplication virale exponentielle. Il existe donc plusieurs systèmes « d'entonnoir », permettant la transmission d'une seule souche virale bien que la diversité génétique intra-individuelle soit importante (Joseph et al. 2015). Le variant ayant transmis l'infection est ainsi appelé **transmis/fondateur** (*transmitted/founder*, T/F).

2. Physiopathologie

L'infection par le VIH-1 conduisant au sida évolue en plusieurs phases qui peuvent se succéder

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

dans le temps (**Figure 11**) :

- **La primo-infection** : deux à six semaines après la contamination, la multiplication virale est active, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires diminue progressivement et le virus se propage dans l'organisme (Sleasman and Goodenow 2003). Elle est aussi appelée phase de virémie aiguë. L'organisme a besoin de six à huit semaines pour mettre en place une défense immunitaire permettant de diminuer la charge virale. La baisse de la charge virale est concomitante d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et la séroconversion se caractérise par l'apparition d'anticorps spécifiques des protéines du VIH-1. Les symptômes cliniques de la primo-infection sont en général similaires à ceux de la mononucléose.
- **La phase asymptomatique ou phase de latence** : elle dure en moyenne une dizaine d'années. La dégradation du système immunitaire est liée à une diminution graduelle du taux de lymphocytes T CD4⁺. Lors de cette période, il y a un équilibre entre la production de virus et son élimination. Le virus peut également rester à l'état latent dans des cellules réservoirs (lymphocytes T CD4⁺ mémoires ou macrophages). C'est durant cette période qu'apparaissent différents variants du virus.
- **La phase symptomatique (sida)** : cette phase, durant laquelle le système immunitaire est très affaibli, est caractérisée par une augmentation importante de la charge virale ainsi que par un effondrement du taux de lymphocytes T CD4⁺ en dessous d'un seuil critique. Cette phase symptomatique dure en moyenne deux à quatre ans et de nombreuses maladies opportunistes apparaissent. Ce sont ces maladies opportunistes qui conduisent à la mort du patient.

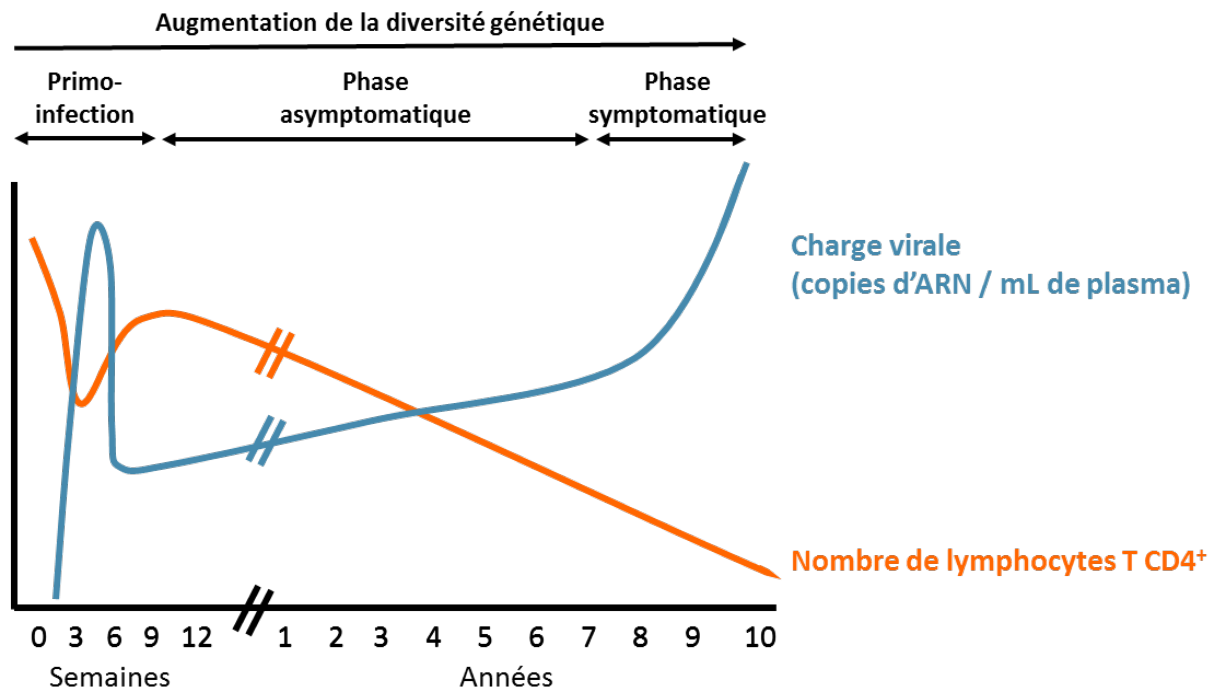


Figure 11 : Evolution naturelle de l'infection par le VIH-1.

Le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue (courbe orange), à l'inverse de la charge virale (copies d'ARN / mL de plasma) qui augmente (courbe bleue) au cours du temps. Il est également rappelé que la diversité génétique intra-individuelle du virus augmente avec l'évolution de l'infection.

3. Réservoir du VIH-1

a. Diversité cellulaire et distribution anatomique

Le réservoir du VIH-1 peut être défini comme l'ensemble des cellules cibles du VIH-1 qui ont intégré le virus dans leur génome. Ces cellules cibles sont nombreuses : lymphocytes T CD4⁺, monocytes-macrophages, cellules dendritiques et cellules de la microglie cérébrale. Certaines de ces cellules ont une demi-vie très longue, ce qui prédit la persistance virale (Strain et al. 2003).

Les compartiments anatomiques identifiés comme réservoirs du VIH-1 sont principalement le tissu lymphoïde associé au tractus digestif ainsi que les ganglions lymphatiques (Estes et al. 2017) (**Figure 12**). Les autres compartiments sont le sang, le cerveau, les poumons, la rate, les reins, le tissu adipeux, la moelle osseuse et le tractus génital.

La diversité des types cellulaires ainsi que leur multiple localisation anatomique, allant du tractus génital au système nerveux central, créent autant de sanctuaires qui peuvent abriter le VIH-1.

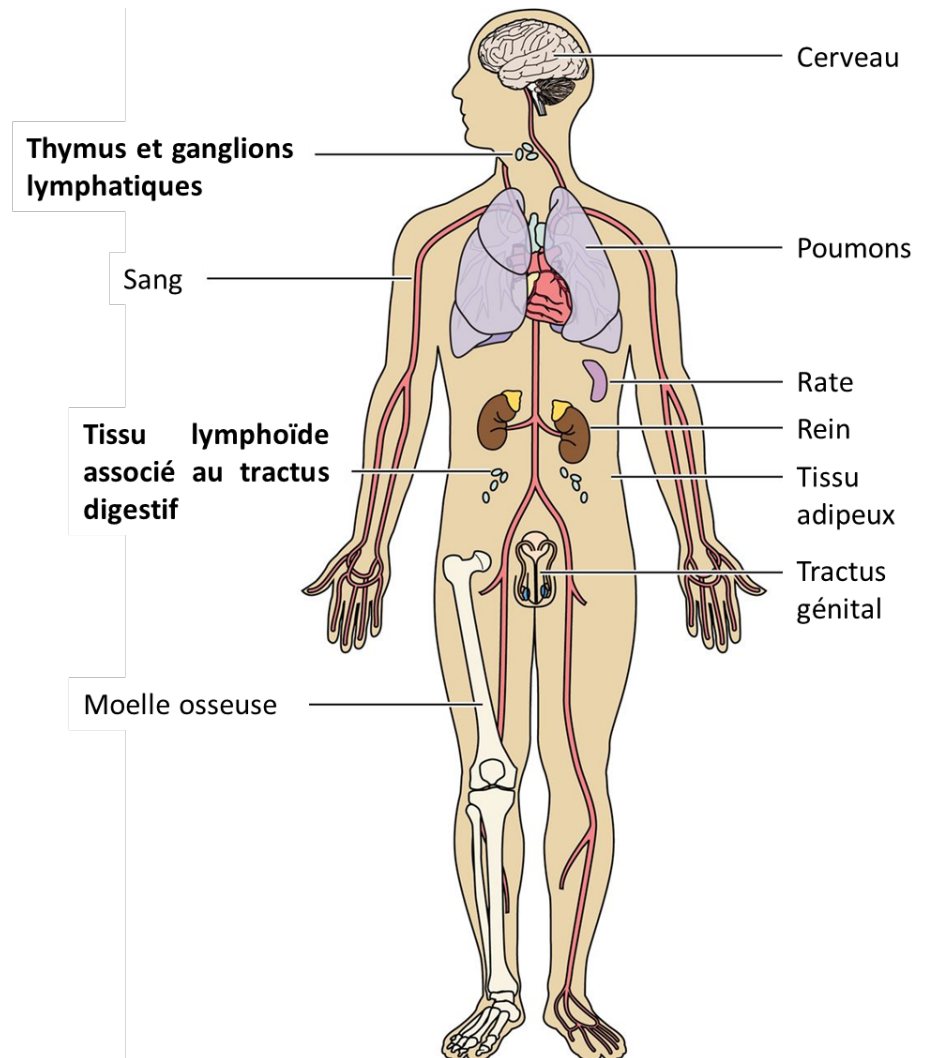


Figure 12 : Distribution anatomique des réservoirs du VIH-1 (Adapté de (Avettand-Fènoël et al. 2016)).

Les compartiments anatomiques identifiés comme réservoirs du VIH-1 sont, par ordre quantitatif décroissant : le tissu lymphoïde associé au tractus digestif, le thymus et les ganglions lymphatiques ainsi que les autres compartiments (sang, cerveau, poumon, rate, rein, tissu adipeux, moelle osseuse et tractus génital) (Estes et al. 2017).

b. Techniques de mesure du réservoir

Différentes techniques de détection et de quantification des réservoirs du VIH-1 sont retrouvées dans la littérature. Elles font appel soit à de la culture virale après induction, soit à de la biologie moléculaire.

La première approche, plus fonctionnelle, consiste à mettre en culture des cellules cibles du VIH-1 puis à les stimuler et enfin à détecter la production de particules virales. Cette technique, nommée QVOA pour *quantitative viral outgrowth assay* a été l'une des premières techniques utilisées historiquement (Chun et al. 1998). Différents types de cellules peuvent ainsi être étudiés, provenant de différents compartiments anatomiques réservoirs, sanguins ou autres.

La seconde approche consiste à mettre en évidence le génome du VIH-1 sous sa forme ADN par des techniques de biologie moléculaire. L'ADN du VIH-1 peut être présent dans la cellule sous formes intégrées (provirus) ou sous formes non-intégrées (cercles 2-LTR, cercles 1-LTR, ADN linéaire non intégré) (Lewin and Rouzioux 2011).

4. Cas particuliers des patients HIC et LTNP

La grande majorité (> 90 %) des personnes infectées par le VIH, dénommée ici individus « progressseurs chroniques » (abrégé en « Chroniques ») (**Figure 13**), va évoluer vers la maladie en absence de traitement antirétroviral, comme détaillé précédemment (voir **paragraphe I-D-2 ci-dessus**).

De façon remarquable, un groupe extrêmement rare de personnes infectées par le VIH (< 1 % des patients) : les *HIV controllers* (HIC), parvient à contrôler spontanément la réplication virale en absence de traitement antirétroviral, maintenant une charge virale en dessous de la limite de détection (**Figure 13**) (Lambotte et al. 2005; Grabar et al. 2009; Sáez-Ciri3n and Pancino 2013).

Un autre groupe de personnes vivant avec le VIH, dénommé *Long-term non-progressors* (LTNP) maintient un statut immunologique stable (taux de lymphocytes T CD4⁺ constant) en absence de thérapie antirétrovirale (**Figure 13**) (Martinez et al. 2005). Les LTNP sont donc capables de préserver une réponse immunitaire mais peuvent cependant présenter une virémie détectable.

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

Certaines personnes vivant avec le VIH cumulent les deux particularités : maintien de la charge virale indétectable et taux de lymphocytes T CD4⁺ constant.

De plus, le réservoir du VIH-1 est significativement plus petit chez les HIC que chez les patients traités, avec une faible concentration d'ADN viral dans différents sous-types de lymphocytes T CD4⁺ circulants dans le sang ainsi que dans le tissu rectal (Deeks and Walker 2007; Dalmaso et al. 2008; Avettand-Fenoel et al. 2008).

Le statut immunologique de ces contrôleurs HIC et LTNP pourrait représenter l'objectif à atteindre par de nouveaux traitements ou de nouvelles stratégies vaccinales. Les virus infectant les HIC ou les LTNP sont capables de se répliquer normalement, le phénotype particulier de ces personnes n'est donc pas lié à une infection par des virus déficients mais vraisemblablement à différentes caractéristiques immunologiques permettant une réponse adéquate face à l'infection (Sáez-Cirión et al. 2011). Ils représentent donc un groupe unique pour l'étude des paramètres associés au contrôle du VIH.

Différentes réponses immunitaires cellulaires ou humorales, que nous détaillerons dans le **paragraphe II ci-dessous**, pourraient donc jouer un rôle dans le contrôle de l'infection observé chez les patients HIC et les LTNP.

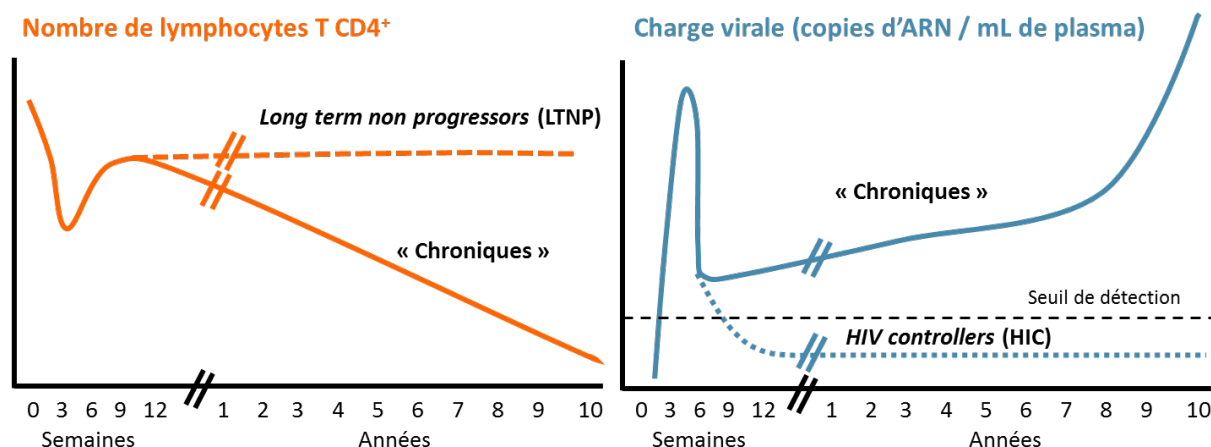


Figure 13 : Différences d'évolution face à l'infection par le VIH-1.

Les personnes vivant avec le VIH appelées ici « Chroniques » présentent, en absence de traitement antirétroviral, une diminution de leur nombre de lymphocytes T CD4⁺ (courbe orange) et une augmentation de leur charge virale (ARN viral / mL de plasma, courbe bleue) au cours du temps. Les patients *Long term non progressors* (LTNP) parviennent à maintenir un taux stable de lymphocytes T CD4⁺ en absence de traitement antirétroviral (courbe pointillée orange), tandis que les patients *HIV controllers* (HIC) parviennent à maintenir une charge virale indétectable en absence de traitement antirétroviral (courbe pointillée bleue).

II. Réponse immunitaire face à l'infection par le VIH-1

Les personnes infectées par le VIH-1 présentent de fortes réponses immunitaires cellulaires et humorales. Cependant, ces réponses se révèlent insuffisantes dans la grande majorité des cas.

La réponse cellulaire adaptative fait référence à l'activité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ tandis que la réponse humorale concerne la production et l'activité des anticorps.

A. Réponse cellulaire adaptative

1. Lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires

Les lymphocytes T CD4⁺ ou lymphocytes T auxiliaires ou *helper* sont les cibles principales du VIH-1. Ils expriment à leur surface le cluster de différenciation 4 (CD4), ce qui leur permet de reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou *human leukocyte antigen* (HLA) de classe II, présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigène.

Ces cellules participent à la lutte contre l'infection de par leur fonction principale de stimulation des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8⁺, mais aussi de par leur activité antivirale directe grâce à la production de cytokines (interféron (IFN)- γ et β -chimiokines).

On distingue parmi les lymphocytes T *helper* (LTh) (Eyerich et al. 2009; Zhu, Yamane, and Paul 2010; Linterman et al. 2011) :

- Les LTh effecteurs, acteurs de la réponse immunitaire (Th1 (soutenant la réponse cellulaire), Th2 (impliqués dans la réponse humorale), Th17, Th9, Th22 et Tfh (lymphocytes T folliculaires *helper*)).
- Les LTh régulateurs, contrôlant la réponse immunitaire (Treg naturels (nTreg), Treg induits (iTreg) et Tfh régulateurs (Tfr)).

La différenciation d'un lymphocyte T CD4⁺ en LTh effecteur est conditionnée par un environnement cytokinique propre à chaque sous-type (**Figure 14**).

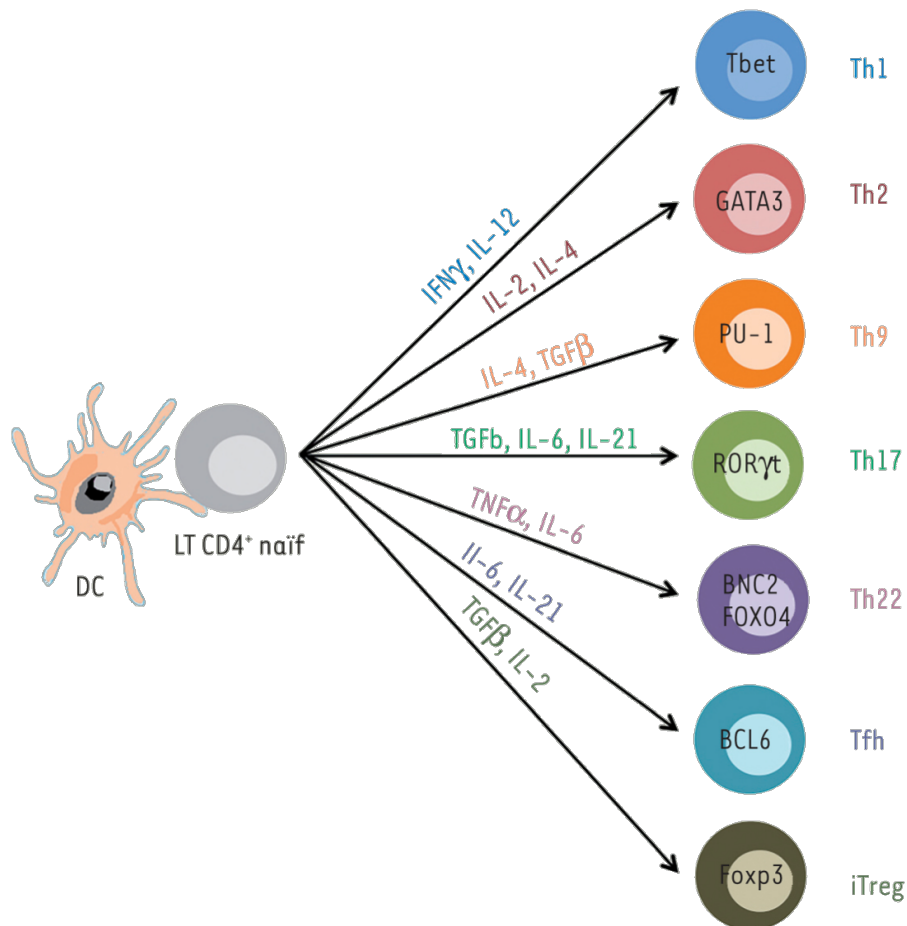


Figure 14 : Différenciation d'un lymphocyte CD4⁺ naïf en lymphocyte T *helper* (Rouers, Jeger-Madiot, et al. 2017).

Selon les cytokines produites par la cellule dendritique (DC), le lymphocyte T (LT) CD4⁺ naïf se différencie en un lymphocyte T *helper* (LTh) particulier. Chaque LTh est associé à l'expression d'un facteur de transcription « signature ».

Bcl6 : *B-cell lymphoma 6*, BNC2 : *Basonuclin 2*, DC : cellule dendritique, FOXO4 : *Forkhead Box O4*, Foxp3 : *forkhead box P3*, GATA3 : *GATA binding protein 3*, IFN : interféron, IL : interleukine, iTreg : *induced T regulatory cell*, LT : lymphocyte T, Tbet : *T-box transcription factor*, Tfh : *T follicular helper cell*, TGF : *transforming growth factor*, Th : T *helper*, TNF : *tumor necrosis factor*, ROR : *RAR-related orphan receptors*.

Les Tfh interagissent avec les lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires, qui sont les organes où sont présentés les antigènes et où les réponses immunitaires s'initient. Cette interaction permet aux lymphocytes B de se différencier en cellules produisant des anticorps de haute affinité, constituant une barrière efficace et durable contre différents pathogènes. Les lymphocytes B se différencient ensuite en cellules mémoires ou en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps (voir **paragraphe II-B-1 ci-dessous**).

2. Lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques

Les lymphocytes T CD8⁺ ou lymphocytes T cytotoxiques expriment à leur surface le CD8, ce qui leur permet de reconnaître les molécules du CMH de classe I, présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme.

La phase de virémie aiguë suivant l'infection par le VIH-1 est associée à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ : leur nombre augmente jusqu'à un taux 20 fois supérieur à la normale, tandis que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue fortement. Les lymphocytes T CD8⁺ peuvent agir contre le VIH de deux manières différentes au cours de la primo-infection : soit en détruisant directement les cellules infectées par le VIH soit en sécrétant des cytokines (IFN- γ , *tumor necrosis factor* (TNF)- α , IL-2) (Betts et al. 2006).

56

B. Réponse humorale

La réponse humorale spécifique est caractérisée par la production d'anticorps spécifiques du VIH-1 suite à l'activation des lymphocytes B.

1. Lymphocytes B

Quatre grandes populations de lymphocytes B, exprimant toutes le marqueur CD19, sont présentes dans le sang (Kaminski et al. 2012) :

- Les lymphocytes B immatures/transitionnels.
- Les lymphocytes B matures naïfs.
- Les lymphocytes B mémoires. Ce sont des cellules quiescentes à longue durée de vie qui pourront rapidement être mobilisées lors d'une seconde rencontre avec l'antigène pour lequel ils ont été sélectionnés.
- Les cellules sécrétrices d'anticorps :
 - Les plasmocytes, qui se différencient dans la moelle osseuse et qui ont une longue durée de vie.
 - Les plasmablastes. Ce sont des plasmocytes à courte durée de vie, sécrétant des quantités importantes d'anticorps dans les organes lymphoïdes secondaires et dans le sang.

Les lymphocytes B mémoires sont essentiels pour maintenir une immunité humorale à long terme et peuvent être divisés en quatre classes en se basant sur l'expression des marqueurs CD21 et CD27 (Moir and Fauci 2009) :

- *Activated memory* (AM) : CD27⁺CD21⁻.
- *Resting memory* (RM) : CD27⁺CD21⁺.
- *Intermediate memory* (IM) : CD27⁻CD21⁺.
- *Tissue like memory* (TLM) : CD27⁻CD21⁻.

Les populations de lymphocytes B du sang sont altérées lors de l'infection par le VIH (Moir and Fauci 2013). Globalement, les lymphocytes B immatures/transitionnels, les plasmablastes, les lymphocytes B AM et TLM sont augmentés dans le sang de patients infectés par le VIH non traités, en comparaison à des donneurs sains. Au contraire, les lymphocytes B RM, impliqués dans le maintien de la réponse humorale, sont diminués (Moir and Fauci 2013).

2. Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques du VIH-1 in vivo

La réponse humorale initiale dirigée contre le VIH-1 peut être détectée environ une semaine après l'infection. Ces premiers anticorps sont dirigés contre la glycoprotéine de fusion gp41 puis contre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (**Figure 15**). Ils sont cependant incapables de neutraliser les particules virales (Tomaras et al. 2008). Les premières activités neutralisantes autologues apparaissent plus tardivement, plusieurs mois après l'infection. Ces anticorps dits autologues reconnaissent uniquement les souches transmises lors des premiers événements de l'infection : les virus transmis/fondateurs (T/F) (Moog, Spenlehauer, et al. 1997). A cause de la pression de sélection liée à cette réponse, de nombreuses mutations apparaissent sur les glycoprotéines d'enveloppe, ce qui induit un échappement viral (Wei et al. 2003). De ce fait, les nouvelles particules virales produites échappent aux anticorps autologues (Moog, Spenlehauer, et al. 1997). Quelques années plus tard (entre deux et quatre ans), des anticorps neutralisants dirigés contre les nouveaux variants se développent. Ces anticorps sont capables de neutraliser de manière croisée différentes souches virales (neutralisation hétérologue). Cependant, seulement 10 à 20 % des individus infectés par le VIH-1 développent ce type d'anticorps (Li et al. 2007; Gray et al. 2009). De plus, seulement 1 % d'entre eux environ démontrent une activité neutralisante large et efficace contre la majorité des isolats primaires en circulation. Ces anticorps sont appelés anticorps neutralisants à large spectre (Simek et al.

2009). Ils résultent d'une longue maturation de la réponse immunitaire et donc de contacts répétés avec l'antigène, nécessitant de nombreuses mutations somatiques et une longue chaîne lourde HCDR3 (*heavy chain complementarity-determining region 3*) (Walker et al. 2011). La longue maturation nécessaire à l'activité de ces anticorps neutralisants à large spectre représente un obstacle au développement d'un vaccin préventif cherchant à induire ce type de réponse (Yu and Guan 2014).

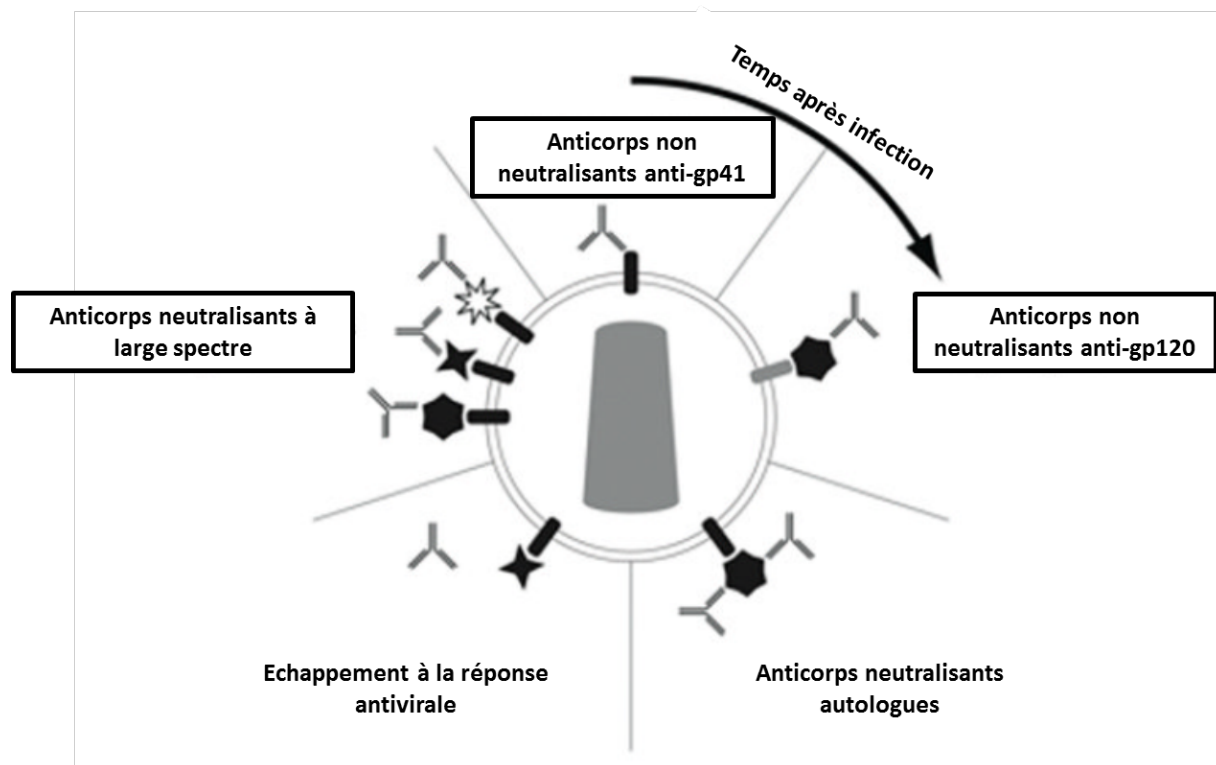


Figure 15 : Réponse humorale face à l'infection par le VIH-1 au cours du temps (Adapté de (Alter and Moody 2010)).

La réponse est initiée par des anticorps non neutralisants dirigés contre les protéines gp41 et gp120 puis par des anticorps neutralisants autologues. Cette réponse entraîne un échappement viral. Une faible proportion de personnes infectées est capable de développer des anticorps neutralisants à large spectre plusieurs années après la séroconversion.

3. Mécanismes d'inhibition du VIH-1 par les anticorps

Les anticorps produits par les lymphocytes B activés peuvent inhiber le VIH-1 grâce à différents mécanismes (**Figure 16**). Ceux-ci dépendent du domaine Fab (*Fragment antigen binding*) (**Figure 16 A**) ou du domaine Fc (Fragment cristallisable) des anticorps (**Figure 16 B et C**), aussi appelés immunoglobulines (voir **paragraphe II-B-4 ci-dessous**).

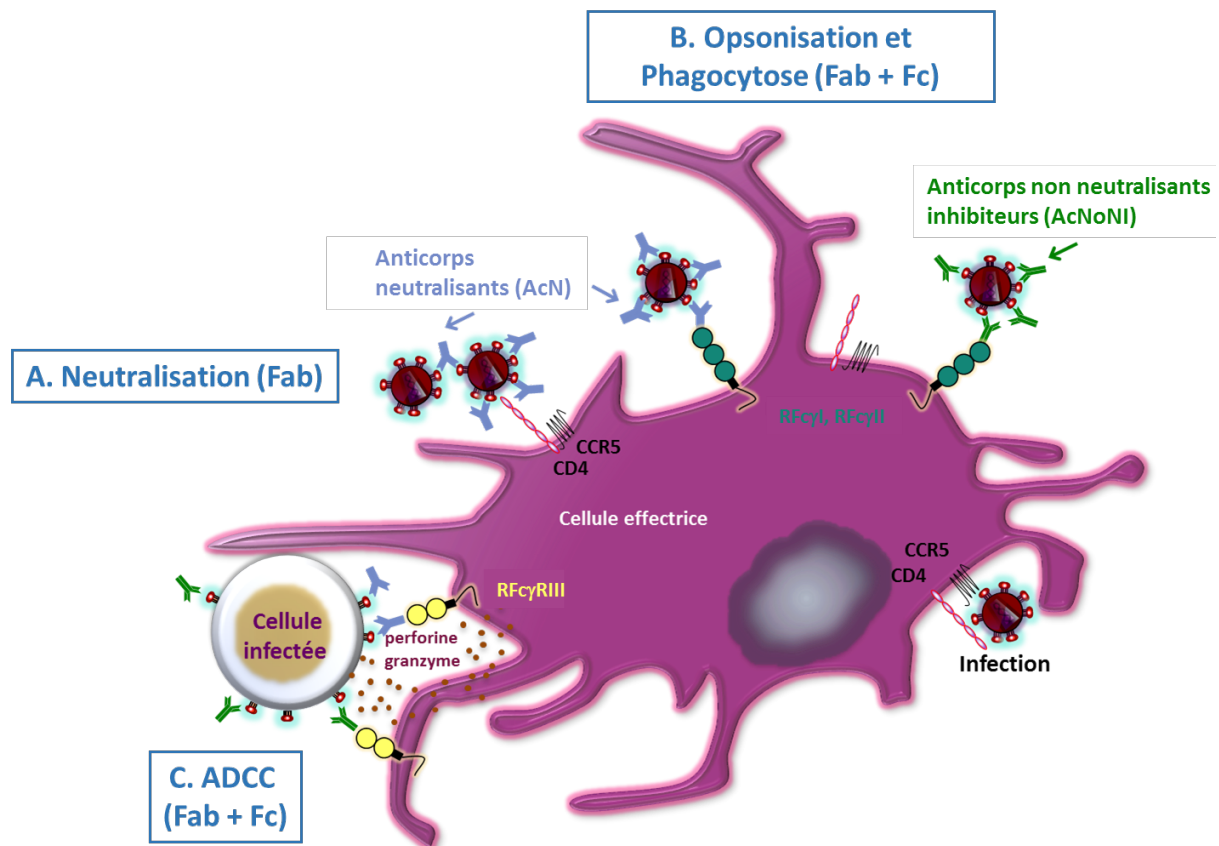


Figure 16 : Différents mécanismes d'inhibition du VIH-1 par les anticorps (Adapté de (Peressin, Holl, and Moog 2014)).

A : Neutralisation des particules virales reconnues par le domaine Fab (*Fragment antigen binding*) des anticorps neutralisants (AcN).

B : Opsonisation des particules virales par les anticorps neutralisants (AcN) ou non neutralisants inhibiteurs (AcNoNI). La liaison entre domaine Fc (Fragment cristallisable) de l'anticorps et le RFc d'une cellule effectrice induit la phagocytose des complexes immuns.

C : L'ADCC (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) correspond à la reconnaissance d'une cellule infectée par un anticorps. La fixation au récepteur Fc spécifique sur une cellule effectrice conduit à la lyse de la cellule infectée.

a. Neutralisation

La neutralisation est la capacité d'un anticorps à inhiber la réplication virale *in vitro*, en l'absence d'autres composants tels que les molécules du complément ou les récepteurs du domaine Fc (RFc) des anticorps (Burton 2002).

La neutralisation requiert l'interaction entre le paratope situé au niveau du domaine Fab de l'anticorps et l'épitope présent sur le virus (**Figure 16 A**). Le recouvrement du virus par les

anticorps est nécessaire et suffisant pour neutraliser la particule virale, empêchant ainsi sa fixation sur sa cellule cible. L'anticorps neutralisant peut donc inhiber des événements survenant après l'attachement : fixation au corécepteur ou fusion du virus (Klasse and Sattentau 2002).

Les anticorps neutralisants (AcN) spécifiques du VIH-1 sont capables de reconnaître des épitopes précis localisés sur les glycoprotéines de surface du virus. Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de l'enveloppe du virus ont été décrits pour leurs capacités à neutraliser un large spectre d'isolats primaires du VIH-1 et seront détaillés dans le **paragraphe II-B-5 ci-dessous**.

b. Mécanismes liés aux récepteurs Fcγ

i. Immunologie des récepteurs Fcγ

Le domaine Fc des anticorps est capable d'interagir avec les récepteurs pour le domaine Fc des immunoglobulines G (IgG) ou RFcγ, présents à la surface de différentes cellules du système immunitaire comme les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK, mais qui sont absents de la plupart des lymphocytes T (Holl, Peressin, Schmidt, et al. 2006; Forthal and Moog 2009).

L'Homme exprime neuf RFcγ : les six RFcγ classiques : RFcγI (CD64), RFcγIIa (CD32a), RFcγIIb (CD32b), RFcγIIc (CD32c), RFcγIIIa (CD16a) et RFcγIIIb (CD16b, spécifique des neutrophiles) ainsi que : RFcn (néonatal), RFcL5 (CD307) et TRIM21 (*tripartite motif-containing protein 21*) (**Figure 17**) (Gillis et al. 2014). Ces récepteurs lient les IgG exprimées à la surface de certaines cellules, à l'exception de RFcn et TRIM21, qui lient les IgG une fois internalisées.

Notre intérêt porte sur les six RFcγ classiques, qui présentent des affinités distinctes pour les différents sous-types d'IgG (IgG1 à 4) (**Figure 19**) et qui diffèrent également par les signaux intracellulaires qu'ils déclenchent. Le RFcγIIb est l'unique récepteur transmettant un signal inhibiteur via un ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Les autres récepteurs, excepté le RFcγIIIb ancré par le GPI (glycosylphosphatidylinositol), transmettent des signaux activateurs via un ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). L'ITAM est présent dans le domaine cytoplasmique du RFcγIIa et du RFcγIIc, tandis que les RFcγI et

RFcγIIIa n'en possèdent pas et doivent interagir avec la chaîne ζ du CD3 (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

La plupart des cellules du système immunitaire expriment à la fois les RFcγ activateurs et inhibiteurs (**Figure 17**). Cependant, les cellules NK et les cellules dendritiques plasmacytoïdes n'expriment que les récepteurs activateurs tandis que les lymphocytes B expriment uniquement les récepteurs de type inhibiteur. De plus, contrairement à ce qui avait été précédemment décrit (**Figure 17**), les lymphocytes T exprimeraient également les RFcγ. L'expression des RFcγ activateurs peut être stimulée par des facteurs pro-inflammatoires tels que le lipopolysaccharide (LPS), des cytokines de type Th1 (IFN-γ) ou de certains composants du système du complément (C5a). Au contraire, les cytokines de type Th2 (interleukine (IL)-4, IL-10, *transforming growth factor* (TGF)-β) peuvent induire la dérégulation de l'expression des RFcγ de type activateur au profit de l'augmentation de l'expression des RFcγ de type inhibiteur.

L'activité biologique des anticorps liée à leurs interactions avec les RFcγ joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire contre le VIH-1, via les activités d'ADCP (*antibody-dependent cellular phagocytosis*), d'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ou d'ADCVI (*antibody-dependent cell-mediated virus inhibition*), mécanismes qui seront détaillés dans les paragraphes suivants.

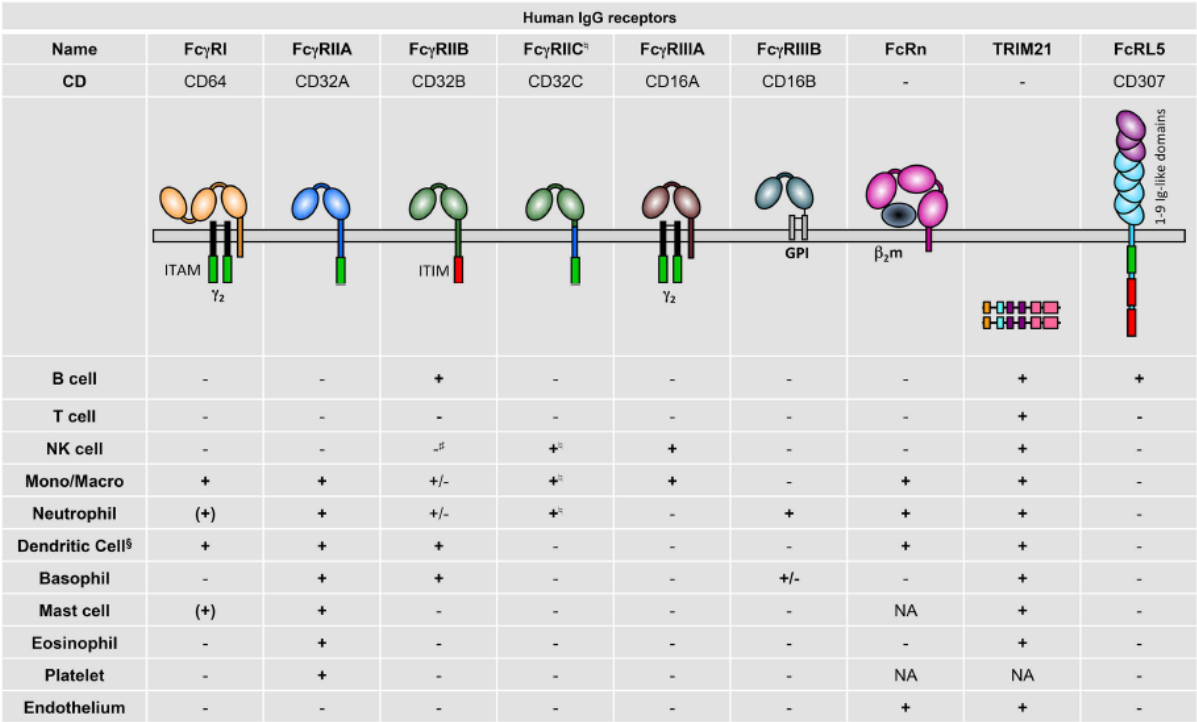


Figure 17 : Expression des récepteurs Fcγ humains en fonction du type de cellule (Gillis et al. 2014).

ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, γ2 : dimère des sous-unités FcRγ, ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, GPI : glycosylphosphatidylinositol, β2m : β2-microglobuline, + : expression, (+) : expression inducible, +/- : rare, - : pas d’expression et NA : non analysé, Mono/Macro : monocytes et/ou macrophages.

ii. Antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP)

La reconnaissance de la particule virale par le domaine Fab de l’anticorps peut être concomitante à l’interaction entre le domaine Fc de ce même anticorps avec les RFcγ exprimés à la surface de certaines cellules immunitaires (Holl et al. 2004; Holl, Peressin, Decoville, et al. 2006; Holl, Peressin, Schmidt, et al. 2006; Peressin et al. 2011). Cette interaction entre le domaine Fc de l’anticorps et son récepteur entraîne la phagocytose de la particule virale opsonisée (**Figure 16 B**). Plusieurs types de cellules sont responsables de ce mécanisme appelé *antibody-dependent cellular phagocytosis* (ADCP) : les monocytes, les macrophages ainsi que les neutrophiles. L’internalisation du pathogène ainsi opsonisé permet ensuite son élimination.

L’activité ADCP peut être détectée en présence d’anticorps neutralisants (AcN) ou de certains anticorps non-neutralisants, alors dénommés anticorps non-neutralisants inhibiteurs

(AcNoNI). Il a été montré que pour certains anticorps spécifiques du VIH-1, la fixation des complexes immuns aux RFcy situés à la surface de cellules présentatrices d'antigènes est capable d'induire une diminution de la réplication virale *in vitro* (Holl, Peressin, Schmidt, et al. 2006). Une étude sur des lignées cellulaires TZM-bl exprimant les RFcy a montré que les RFcyI et RFcyIIb potentialisaient les activités neutralisantes d'anticorps dirigés contre la gp41 (Perez et al. 2009). Les auteurs suggèrent deux mécanismes possibles pour cette potentialisation des effets des anticorps : une meilleure cinétique par exposition des anticorps à la surface de la cellule ou bien la phagocytose. Une autre étude dans un modèle de lignée cellulaire exprimant les RFcy incubée avec des billes couplées à la gp120 a démontré une activité de phagocytose médiée par le domaine Fc des anticorps (Ackerman et al. 2013).

Des études ont montré que cette activité ADCP était associée à une activité protectrice dans le modèle macaque après une infection par voie rectale (Barouch et al. 2013, 2015; Tuero et al. 2015).

iii. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)

L'*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) est un mécanisme impliquant à la fois des composants de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. L'anticorps fixé par son domaine Fab sur la cellule infectée (exprimant à la surface les protéines d'enveloppe du VIH-1) est reconnu via son domaine Fc par le Rfc d'une cellule NK (**Figure 16 C**). Cette interaction entraîne la destruction de la cellule infectée par la libération par la cellule NK de granules cytotoxiques (granzymes et perforine), de chimiokines, d'oxyde nitrique ou de dérivés réactifs de l'oxygène (Chung et al. 2008; Lee and Kent 2018).

iv. Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI)

L'*antibody-dependent cell-mediated virus inhibition* (ADCVI) est similaire à l'ADCC, résultant de l'interaction entre des cellules cibles, des anticorps et des cellules exprimant les RFcy. L'ADCC se focalise sur la mortalité des cellules infectées, tandis que l'ADCVI mesure, *in vitro*, l'effet global des anticorps sur la réplication du virus en présence de cellules effectrices. Une partie de l'ADCVI est ainsi le reflet de l'ADCC, mais des effets non cytolytiques comme l'inhibition dépendante des RFcy ou la production de β -chimiokines peuvent également jouer un rôle dans l'inhibition du virus (Forthal and Moog 2009).

v. Antibody-dependent complement deposition (ADCD)

Le système du complément est composé de plusieurs protéines et constitue un élément clé de la réponse immunitaire innée. Il peut également faire le lien entre la réponse innée et adaptative, par une activation suite à la reconnaissance d'un pathogène (voie alterne et voie des lectines) ou suite à la reconnaissance d'un anticorps fixé à la surface d'un pathogène ou d'une cellule infectée. Les trois voies du complément (classique, voie des lectines et voie alterne) convergent toutes vers la formation du complexe d'attaque membranaire, qui permet la lyse du pathogène ou de la cellule infectée (Blue, Spiller, and Blackbourn 2004). En plus de cette activité de lyse, le complément possède des propriétés d'opsonisation, déclenchant la phagocytose, ainsi que des propriétés de chimiotactisme.

Même si la voie classique du complément joue un rôle important dans la lyse du VIH-1 au cours de l'infection, certaines études démontrent que cette activité est faible en comparaison à d'autres virus. De plus, le complément pourrait jouer un rôle néfaste en favorisant l'infection des cellules attirées par chimiotactisme (cellules dendritiques, macrophages ou lymphocytes T) (Blue, Spiller, and Blackbourn 2004; Huber and Trkola 2007; Stoiber et al. 2008).

Lors du bourgeonnement du VIH-1, des protéines cellulaires impliquées dans la régulation du complément, comme CD46 (MCP, *membrane cofactor protein*) ou CD55 (DAF, *decay-accelerating factor*), sont incorporées dans l'enveloppe de la particule virale, ce qui permet au virus d'échapper au système du complément (Stoiber et al. 2008).

vi. Antibody-dependent cellular trogocytosis (ADCT)

La trogocytose est un processus biologique durant lequel des fragments de membrane plasmique sont transférés entre deux cellules immunitaires au sein d'une synapse immunologique. Deux types de trogocytose existent : la trogocytose médiée par des molécules d'adhésion (lors de la lésion des molécules du CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD8⁺ par exemple) et l'*antibody-dependent cellular trogocytosis* (ADCT), qui implique la liaison d'un anticorps à un antigène à la surface de la cellule cible et la liaison concomitante de la partie Fc de l'anticorps à un récepteur Fc sur la cellule effectrice. La trogocytose médiée par le domaine Fc a déjà été décrite pour les anticorps anticancéreux et entraîne l'élimination des fragments de membranes des cellules cibles.

Dans une étude récente, Richardson *et al.* ont développé un test afin d'étudier l'ADCT des anticorps anti-VIH à partir de prélèvements de patients infectés (Richardson, Crowther, et al. 2018). Les auteurs ont ainsi montré des activités ADCT supérieures chez les patients développant des anticorps neutralisants à large spectre. Les activités ADCT étaient corrélées à la puissance de neutralisation alors qu'aucune corrélation n'a été trouvée avec les activités d'ADCP, d'ADCC ou d'ADCD. Les auteurs suggèrent donc que l'ADCT représente une nouvelle activité médiée par le domaine Fc des anticorps, qu'il serait intéressant de développer dans le cadre d'un vaccin préventif ou curatif contre le VIH.

4. Sous-types d'IgG et contrôle du VIH-1

Les immunoglobulines G (IgG) représentent 10 à 20 % des protéines du plasma et sont la classe majeure (75 %) des cinq classes d'immunoglobulines humaines (IgM, IgD, IgG, IgA et IgE) (Vidarsson, Dekkers, and Rispens 2014).

Les IgG sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes lourdes (H pour *heavy*) ainsi que deux chaînes légères (L pour *light*) (**Figure 18**). Chaque chaîne lourde est constituée d'un domaine N-terminal variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) ainsi que d'une région additionnelle : la région charnière, située entre les domaines CH1 et CH2. De la même façon, les chaînes légères sont constituées d'un domaine N-terminal variable (VL) et d'un domaine constant (CL). La chaîne légère s'associe aux domaines VH et CH1 pour former le domaine Fab (*fragment antigen binding*), reconnaissant les épitopes. La partie basse de la région charnière et les domaines CH2 et CH3 forment le domaine Fc (fragment cristallisable), reconnu par les RFcy à la surface des cellules immunitaires. Ces domaines Fab et Fc permettent les différentes activités antivirales des anticorps décrites dans le **paragraphe II-B-3 ci-dessus**.

Les IgG sont divisées en quatre sous-types, nommés en fonction de leur abondance décroissante : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

La diversification isotypique des IgG intervient dans le processus de différenciation des lymphocytes B et de maturation de la réponse anticorps, qui se produit dans les centres germinaux des follicules lymphoïdes à la suite de l'interaction entre les lymphocytes B naïfs

avec des cellules dendritiques folliculaires et des lymphocytes T folliculaires auxiliaires (appelées lymphocytes Tfh pour *follicular helper T cells*) (Ma et al. 2012).

La commutation isotypique des immunoglobulines au cours de la différenciation des lymphocytes B ou commutation de classe se produit par la recombinaison des gènes de la chaîne lourde de l'immunoglobuline, avec une commutation en IgG2 et IgG4 en aval des IgG3 et IgG1 (Pan-Hammarström, Zhao, and Hammarström 2007), ce qui entraîne un élargissement des fonctions médiées par le domaine Fc des IgG ainsi que des différences de structure en fonction du sous-type d'IgG (**Figure 18**). Les quatre sous-types d'IgG sont ainsi hautement conservés et diffèrent dans la structure de leur domaine constant et plus particulièrement dans la région charnière et le domaine CH2 (Vidarsson, Dekkers, & Rispens, 2014).

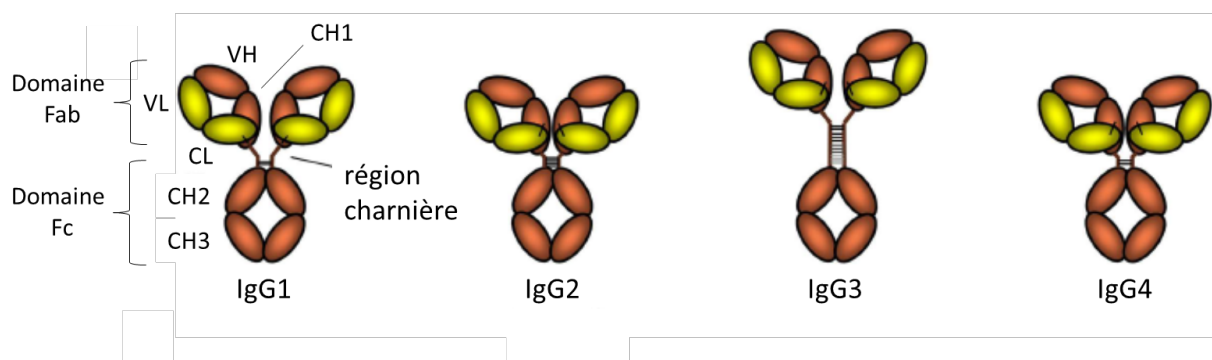


Figure 18 : Différence de structures des quatre sous-types d'immunoglobulines G (IgG) (Adapté de (Vidarsson, Dekkers, and Rispens 2014)).

Les IgG sont constituées de deux chaînes lourdes (H pour *heavy*), en rouge et de deux chaînes légères (L pour *light*), en jaune. Chaque chaîne lourde est constituée d'un domaine N-terminal variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) ainsi que d'une région charnière. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine N-terminal variable (VL) et d'un domaine constant (CL). Le domaine Fab (*fragment antigen binding*) est formé par la chaîne légère et les domaines VH et CH1. Le domaine Fc (fragment cristallisable) est formé par la partie basse de la région charnière et les domaines CH2 et CH3. La liaison des chaînes, la longueur de la région charnière et le nombre de ponts disulfures connectant les deux chaînes lourdes sont indiqués pour les quatre sous-types d'IgG.

De plus, les sous-types d'IgG possèdent des affinités différentes pour les différents récepteurs Fcγ (RFcγ) présents à la surface des cellules immunitaires (**Figure 19**). Les IgG1 et les IgG3 possèdent ainsi de fortes affinités pour les RFcγ.

Human IgG receptors													
Name	FcγRI	FcγRIIA		FcγRIIB		FcγRIIC		FcγRIIIA		FcγRIIIB	FcRn	TRIM21	FcRL5
CD	CD64	CD32A		CD32B		CD32C		CD16A		CD16B	-	-	CD307
Gene	FCGR1A	FCGR2A		FCGR2B		FCGR2C		FCGR3A		FCGR3B	FCGRT	TRIM21	FCRL5
Alleles	I ₁	H ₁₃₁	R ₁₃₁	I ₂₃₂	T ₂₃₂	Q ₁₃	stop ₁₃	V ₁₅₈	F ₁₅₈	NA1, NA2, SH	I ₁	I ₁	I ₁
IgG1	6x10 ⁷	5x10 ⁶	3x10 ⁶	1x10 ⁵	ND	1x10 ⁵	-	2x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵	8x10 ⁷	5x10 ⁶	1x10 ⁶
IgG2	-	4x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁴	ND	2x10 ⁴	-	7x10 ⁴	3x10 ⁴	-	5x10 ⁷	5x10 ⁶	variable
IgG3	6x10 ⁷	9x10 ⁵	9x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	1x10 ⁷	8x10 ⁶	1x10 ⁶	3x10 ⁷	2x10 ⁶	1x10 ⁵
IgG4	3x10 ⁷	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	2x10 ⁵	-	2x10 ⁷	5x10 ⁶	1x10 ⁶
Major role	Activation	Activation		Inhibition		Activation		Activation		Uptake; Activation [#]	IgG recycling; transport	Activation; proteasome addressing	Activation Proliferation Differentiation

Figure 19 : Affinité des quatre sous-types d'immunoglobulines G (IgG) pour les récepteurs Fcγ (Gillis et al. 2014).

Les allèles sont identifiés par le variant d'acide aminé dans la protéine (par exemple H131) ou par le nom des variants alléliques (NA1, NA2 ou SH). Les affinités de liaison pour les sous-types d'immunoglobulines sont indiquées en M⁻¹. Les interactions de haute affinité sont indiquées en gras.

ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, γ₂ : dimère des sous-unités FcRγ, ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, GPI : glycosylphosphatidylinositol, β₂m : β₂-microglobuline, - : pas de liaison, ND : non déterminé, q : aucun variant allélique n'a encore été décrit affectant l'affinité de liaison, # : s'associe aux intégrines.

Le changement vers les différents sous-types d'IgG pourrait participer au contrôle de la réplication du VIH observé chez les HIC. En effet, une étude a démontré un lien entre le contrôle de l'infection et la capacité des sérums des HIC à effectuer de multiples fonctions effectrices (polyfonctionnalité) (Ackerman et al. 2016). Dans cette étude, la phagocytose, la liaison au Fc, l'ADCC et l'activation de la cascade du complément ont été étudiées. Or, ces activités sont liées à la capacité des anticorps à lier les RFcγ, qui est directement influencée par le sous-type d'IgG (**Figure 19**).

De plus, une étude récente a montré un lien entre la diversité des sous-types d'IgG et le développement d'anticorps neutralisants à large spectre, également corrélée à la polyfonctionnalité des domaines Fc des anticorps (Richardson et al. 2018).

De nombreuses études soulignent ainsi l'intérêt des différents sous-types d'IgG dans le contrôle de l'infection par le VIH-1 et seront détaillées dans les paragraphes suivants.

a. IgG1

Les IgG1 sont les IgG les plus abondantes dans le sérum (66 %).

Le sous-type d'IgG anti-VIH-1 majoritaire est le sous-type IgG1, avec des réponses dirigées contre toutes les protéines du virus (Env, Pol et Gag). Cependant, même si les réponses spécifiques du VIH-1 sont principalement du sous-type IgG1, les proportions des différents sous-types d'IgG sont variables selon les individus, leur statut HLA ainsi que leurs paramètres cliniques (Binley et al. 2008; Banerjee et al. 2010; French et al. 2013; Ackerman et al. 2016).

La plupart des anticorps neutralisants monoclonaux développés jusqu'ici sont de sous-type IgG1 (2F5, IgG1 b12, 2G12...) (voir **paragraphe II-B-5 ci-dessous**). De plus, les IgG1 et les IgG3 possèdent de plus fortes affinités pour les RFcγ que les IgG2 et les IgG4 (**Figure 19**) (Vidarsson, Dekkers, and Rispen 2014).

Plusieurs études effectuées principalement sur des cohortes d'individus infectés par un virus de sous-type B ont démontré que les niveaux d'IgG1 anti-p24 étaient associés au contrôle viral ainsi qu'à une progression plus lente vers la maladie (pour résumé (French, Abudulai, and Fernandez 2013)). Plus récemment, une autre étude effectuée cette fois sur des individus chroniquement infectés par un virus de sous-type C et traités par des antirétroviraux, a montré que les IgG1 anti-p24 étaient le seul sous-type d'IgG associée au contrôle viral (Chung et al. 2018). Les forts taux d'IgG1 étaient également associés à de plus fortes réponses ADCP et ADCC.

De façon intéressante, une étude récente chez des souris a montré que la glycosylation de l'enveloppe du VIH impactait les réponses en sous-types d'IgG (Heß et al. 2019). Les auteurs ont identifié le domaine C2V3 de l'enveloppe comme responsable de fortes réponses de sous-type IgG1 ainsi que de la production de cytokines de type Th2. En supprimant tous les sites de glycosylation potentiels du domaine C2V3 par mutagenèse, les réponses induites par vaccination ont changé vers une réponse Th1 et un équilibre entre les sous-types IgG2a et

IgG1.

b. IgG2

Les IgG2 sont présentes de façon moins importante que les IgG1 dans le sérum, elles représentent 23 % des IgG.

De façon intéressante, il a été reporté que les IgG2 sont très rares chez les personnes avec un stade avancé d'infection par le VIH (Mergener et al. 1987) et que de faibles taux d'IgG2 anti-gp41 pourraient être corrélés à des manifestations cliniques (Lal et al. 1991).

En addition à des activités de neutralisation et d'inhibition médiées par leur domaine Fc, les IgG2 pourraient également participer à la régulation de la réponse immune. En effet, la plupart des IgG2 reconnaissent des phospholipides et des carbohydrates (Mikolajczyk et al. 2004) et il a été montré que les anticorps anti-phospholipides augmentaient transitoirement durant la phase aigüe de la plupart des maladies infectieuses et pourraient avoir des fonctions régulatrices bénéfiques (Avrameas et al. 2007).

c. IgG3

Les IgG3 sont présentes en moindre quantité dans le sérum (7 % des IgG).

Tout comme les IgG1, les IgG3 possèdent de fortes affinités pour les RFcγ (Vidarsson, Dekkers, and Rispen 2014) et ont donc des activités antivirales supérieures.

Il a été proposé que le sous-type IgG3 puisse permettre d'augmenter la fonction inhibitrice des anticorps (Cavacini et al. 2003).

L'étude des prélèvements de l'essai vaccinal de phase III RV144, ayant montré un taux de protection de 31 % (Rerks-Ngarm et al. 2009), a pour la première fois prouvé l'intérêt de ce sous-type dans le cadre d'une infection par le VIH-1, en démontrant que des réponses anticorps de sous-type IgG3 dirigées contre la protéine Env étaient détectées et entraînaient une diminution du risque d'infection (Yates et al. 2014).

d. IgG4

Les IgG4 ne représentent que 4 % des IgG présentes dans le sang.

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

A l'heure actuelle, aucune étude n'a montré de rôle de ce sous-type IgG4 dans la protection contre l'infection par le VIH.

5. Anticorps neutralisants dirigés contre l'enveloppe du VIH-1

Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de l'enveloppe du virus ont été décrits pour leurs capacités à neutraliser un large spectre d'isolats primaires du VIH-1 (Figure 20).

70

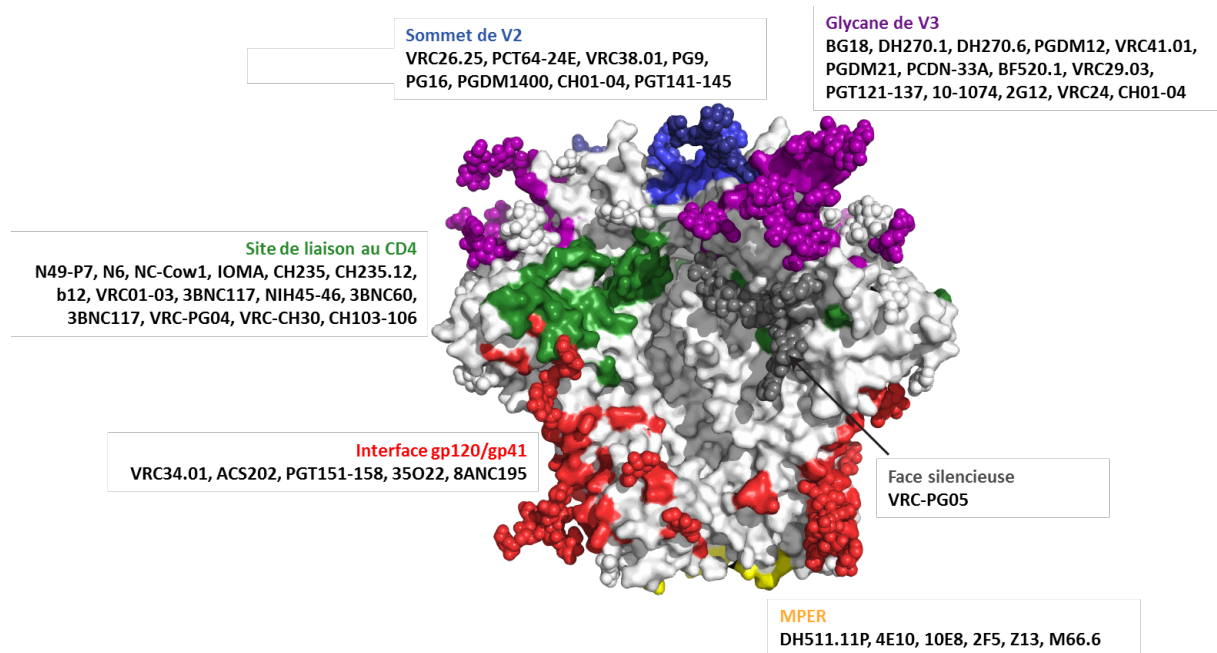


Figure 20 : Sites de reconnaissance des principaux anticorps neutralisants (Adapté de (Sok and Burton 2018)).

Les régions de l'enveloppe trimerique SOSIP.664 (souche de VIH BG505 SOSIP.664) ciblées par les anticorps neutralisants ont été représentées en : bleu : sommet de V2, violet : glycane de V3, vert : site de liaison du CD4, gris foncé : face silencieuse, rouge : interface gp120/gp41 et jaune : *membrane proximal external region* (MPER). Une liste non exhaustive d'anticorps neutralisants monoclonaux développés est donnée pour chaque région.

a. Anticorps dirigés contre le site de fixation au CD4

La reconnaissance des épitopes du site d'attachement au CD4 peut s'effectuer par le biais de la chaîne lourde de l'anticorps, comme c'est le cas pour le premier anticorps identifié : b12 (Barbas et al. 1992; Burton et al. 1994).

D'autres anticorps sont capables de mimer le CD4 grâce à leurs chaînes lourdes, comme les anticorps VRC01-03, 3BNC117, NIH45-46, 8ANC131, N49-P7, N6.... Cette particularité provient d'importantes mutations somatiques effectuées sur deux gènes codant la chaîne lourde (VH1-2 et VH1-46).

b. Anticorps dirigés contre le sommet de la boucle V2 de la gp120

Ces anticorps ciblent le sommet du trimère Env et possèdent une longue chaîne lourde (long domaine CDR3 : *complementarity determining region 3*), ce qui leur permet d'atteindre les épitopes à travers le bouclier glycanique (Sok and Burton 2018). Il s'agit par exemple du PG9, PG16, CH01-04, VRC26.25, PCT64-24E....

c. Anticorps dirigés contre le glycane de la boucle V3 de la gp120

Ces anticorps sont les plus communs lors d'une infection par le VIH. Ils subissent une hypermutation somatique plus poussée, ce qui leur confère une forte affinité de liaison (Kwong and Mascola 2012). Il s'agit notamment des anticorps 10-1074, PGT121, PGT123, BG18, DH270.1...

d. Anticorps dirigés contre la région MPER de la gp41

Les anticorps dirigés contre la région MPER de la gp41 reconnaissent des résidus hydrophobes, certains peptides, ainsi que des séquences situées avant le domaine transmembranaire (Kwong, Mascola, and Nabel 2013). On peut notamment citer les anticorps DH511.11P, 4E10, 2F5, 10E8...

La région MPER représente ainsi un site intéressant à cibler afin d'inhiber l'étape précoce de fusion.

e. Anticorps dirigés contre l'interface gp120/gp41

Certains anticorps de la seconde génération, comme le 8ANC et le PGT151-158 reconnaissent des nouveaux épitopes viraux tels que l'interface entre la gp120 et la gp41.

Cette nouvelle génération d'anticorps est deux à trois fois plus efficace que la précédente (Burton and Hangartner 2016; Kong et al. 2016).

f. Anticorps dirigés contre la face silencieuse de la gp120

Enfin, un nouveau site de liaison a récemment été défini par l'anticorps VRC-PG05, qui reconnaît le centre de la « face silencieuse » de la gp120 (Zhou et al. 2018), ainsi appelée lors de la première description de la gp120, lorsqu'on pensait qu'elle était immunologiquement silencieuse (Wyatt and Sodroski 1998).

6. Etude du rôle des anticorps *in vivo*

Plusieurs études menées *in vivo* dans le modèle NHP (*non-human primate*) de singe rhésus macaque ont permis d'appréhender le rôle de la réponse humorale dans la protection contre le VIH-1. En effet, le transfert passif d'anticorps neutralisants dans ce modèle NHP a permis de démontrer le rôle protecteur des anticorps neutralisants contre l'infection par le virus chimérique SHIV (*simian-human immunodeficiency virus*) administré par voies intraveineuse, intra-rectale et vaginale (protection stérilisante) (Mascola et al. 2000; Hessel et al. 2007, 2010; Moldt et al. 2012). L'efficacité des anticorps neutralisants a aussi été montrée dans des études chez des macaques nouveau-nés, après infection par voie orale (Baba et al. 2000; Ferrantelli et al. 2004).

D'autres études ont démontré que l'inoculation d'une combinaison de plusieurs anticorps neutralisants entraîne une efficacité protectrice plus efficace et beaucoup plus prolongée dans le temps (Moldt et al. 2012; Horwitz et al. 2013; Nishimura et al. 2017).

Enfin, deux études récentes ont montré que l'induction d'anticorps à des temps très précoces de l'infection entraîne une élimination complète du virus dans des modèles de macaques (Hessel et al. 2016; Liu et al. 2016). Liu *et al.* ont observé l'élimination des premiers foyers d'infection chez des macaques traités avec un anticorps neutralisant à large spectre, administré un jour après une infection avec une forte dose de virus (Liu et al. 2016). Hessel *et al.* ont quant à eux montré que le traitement de macaques nouveau-nés par plusieurs anticorps, un jour après une infection par voie orale, est capable d'éliminer les premiers foyers d'infection (Hessel et al. 2016). Les anticorps neutralisants à large spectre seraient donc également capables d'éliminer les premières cellules infectées. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'élimination de ces foyers d'infection sont encore à étudier. Ces résultats très encourageants démontrent l'importance des études sur le rôle des anticorps spécifiques du VIH-1 *in vivo* (Barin and Braibant 2019).

Les stratégies vaccinales devront prendre en compte ces différentes activités inhibitrices des anticorps afin d'identifier et d'induire des anticorps capables d'empêcher l'infection des cellules cibles et de prévenir la formation des premiers foyers d'infection.

7. Anticorps neutralisants en thérapie

Le développement d'un vaccin préventif contre le VIH représente un des axes majeurs dans la lutte contre ce virus. Ainsi, de nombreux essais vaccinaux contre le VIH ont été développés (**Tableau 3**).

Les premiers essais vaccinaux avaient pour but de développer des immunogènes capables d'induire des anticorps neutralisants à large spectre à partir des glycoprotéines d'enveloppe (protéines recombinantes de la gp120 et gp160). Cependant, jusqu'à présent, aucun essai vaccinal ne s'est révélé efficace dans l'induction de ces anticorps neutralisants à large spectre (Flynn et al. 2005; Pitisuttithum et al. 2006; Mascola and Montefiori 2010; Hammer et al. 2013).

D'autres équipes se sont orientées vers le développement d'immunogènes capables d'induire une réponse cellulaire cytotoxique efficace, notamment grâce aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. En effet, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques est corrélée à la diminution de la charge virale au cours de la primo-infection. Ainsi, les essais réalisés dans le modèle NHP ont démontré que la réponse cytotoxique permet de contrôler la virémie (Hirsch et al. 1994; Shiver et al. 2002). De plus, il a été montré que le contrôle de la virémie observé chez les contrôleurs du VIH (voir **paragraphe II-C-1 ci-dessous**) est corrélé à une forte réponse cellulaire cytotoxique (International HIV Controllers Study et al. 2010). Ces études soulignent donc l'importance de la réponse cellulaire cytotoxique dans la protection contre l'infection par le VIH-1. L'essai vaccinal Step (aussi dénommé *HIV Vaccine Trials Network* (HVTN) 502) a ainsi utilisé un vecteur adénovirus non répliquatif recombinant (Ad5) exprimant les protéines Gag, Pol et Nef du VIH-1 dans le but d'induire une réponse lymphocytes T CD8⁺ cytotoxique efficace (**Tableau 3**). Cependant, la réponse lymphocytes T CD8⁺ induite n'a pas démontré de protection et un risque significativement plus élevé d'infection a été observé dans le groupe vaccin. L'essai vaccinal Phambili démarré en Afrique du Sud sur le même principe a ainsi été interrompu et seulement 801 personnes ont été incluses sur les 3000 initialement prévues, à cause des résultats négatifs de l'essai Step (**Tableau 3**).

La recherche vaccinale s'est alors tournée vers l'utilisation de stratégies vaccinales combinées, associant différents candidats vaccinaux délivrés en plusieurs étapes : stratégie *prime/boost* (primo-vaccination/rappel). L'essai vaccinal thaïlandais **RV144** effectué sur plus de 16 000 volontaires sains fut ainsi le premier essai ayant démontré une efficacité protectrice, même si elle fut modeste (31 % de protection) (**Tableau 3**). Cet essai en *prime/boost* correspondait à plusieurs injections d'un vecteur canarypox contenant les protéines virales du VIH-1 (Gag, Pol, Env) (ALVAC-HIV), suivies de deux rappels contenant deux protéines gp120 recombinantes (AIDSVAX B/E). De multiples activités antivirales des anticorps impliquées dans la protection contre l'infection par le VIH-1 ont pu être mises en évidence grâce à cet essai (Rerks-Ngarm et al. 2009). Il représente donc une avancée majeure dans la recherche vaccinale.

Malgré les difficultés rencontrées lors du développement des essais vaccinaux, des recherches de nouveaux immunogènes capables d'induire des réponses humorales et cellulaires efficaces se poursuivent. Les nouvelles technologies telles que le séquençage à haut débit (NGS : *next-generation sequencing*) et le *single B cells cloning*, permettant d'isoler spécifiquement les lymphocytes B capables d'induire des anticorps neutralisants sont notamment très prometteuses. Ces méthodes vont permettre de caractériser des anticorps neutralisants *in vitro* et *ex vivo*. Elles permettront d'identifier de nouveaux épitopes reconnus par des anticorps neutralisants et de produire des immunogènes afin d'induire ces anticorps par vaccination (Burton and Hangartner 2016; McCoy and Burton 2017).

Plus récemment, un essai vaccinal de phase I/IIa a récemment testé un candidat vaccin utilisant un virus mosaïque Ad26 (adenovirus serotype 26) exprimant les gènes Env/Gag/Pol de différentes souches du VIH-1 chez 393 adultes ainsi que dans un modèle de macaques rhésus (Barouch et al. 2018). Ce candidat vaccin a induit de fortes réponses immunitaires à la fois chez l'Homme et chez le singe et a permis une protection de 67 % des animaux contre l'acquisition d'un virus SHIV. Ce concept vaccinal est actuellement évalué en essai clinique de phase IIb (HVTN705) sur 2600 femmes en Afrique subsaharienne (**Tableau 3**). Les résultats devraient être connus d'ici 2022.

Introduction : Réponse immunitaire face à l'infection par le VIH-1

Essai vaccinal	Date	Composants du vaccin	Cible immunologique	Participants	Pays	Taux d'infection
VAX004	1998 - 2002	gp120 recombinante (B/E)	Anticorps neutralisants	5403 personnes à haut risque de transmission sexuelle	Etats-Unis, Canada, Pays-Bas	Groupe vaccin : 6,7 % Groupe placebo : 7 % Non significatif
VAX003	1999 - 2002	gp120 recombinante (B/E)	Anticorps neutralisants	2546 usagers de drogues injectables	Thaïlande	Groupe vaccin : 8,4 % Groupe placebo : 8,3 % Non significatif
Step	2004 - 2007	Adénovirus 5 recombinant, exprimant les protéines virales Gag, Pol, Nef (B)	Réponse lymphocytes T CD8 ⁺	3000 personnes à haut risque de transmission sexuelle	Amérique du Nord, Amérique du Sud, Caraïbes, Australie	Groupe vaccin : 4,6 % Groupe placebo : 3,1 % Risque significativement plus élevé d'infection dans le groupe vaccin (p = 0,07)
Phambili	2007	Adénovirus 5 recombinant, exprimant les protéines virales Gag, Pol, Nef (B)	Réponse lymphocytes T CD8 ⁺	801 personnes à haut risque de transmission sexuelle	Afrique du Sud	Groupe vaccin : 8,4 % Groupe placebo : 7 % Non significatif
RV144	2003 - 2009	<i>Prime</i> : virus canarypox exprimant les protéines Gag, Pol, Env (E) <i>Boost</i> : gp120 recombinante (B/E)	Anticorps neutralisants	16 402 personnes en population générale	Thaïlande	Groupe vaccin : 0,192 % Groupe placebo : 0,279 % p = 0,04 Protection de 31,2 % à 3,5 ans
HVTN505	2009 - 2013	<i>Prime</i> : ADN gag, pol, nef (B) et ADN env (A, B, C) <i>Boost</i> : Adénovirus 5 recombinant, exprimant les protéines virales Gag, Pol (B) et adénovirus 5 recombinant, exprimant Env (A, B, C)	Réponse lymphocytes T CD8 ⁺	2496 personnes à haut risque de transmission sexuelle	Etats-Unis	Groupe vaccin : 2,7 % Groupe placebo : 2,1 % Non significatif

Introduction : Réponse immunitaire face à l'infection par le VIH-1

HVTN702 « Uhambo »	Lancé en octobre 2016	<i>Prime</i> : virus canarypox exprimant les protéines Gag, Pol, Env (E) <i>Boost</i> : gp120 recombinante (B/E)	Anticorps neutralisants	5400 adultes à risque d'infection	Afrique du Sud	Résultats attendus en 2022
HVTN705 « Imbokodo » (essai de phase IIb)	Lancé en novembre 2017	<i>Prime</i> : adénovirus 26 « mosaïque » <i>Boost</i> : gp140 recombinante	Anticorps neutralisants	2600 femmes	Afrique du Sud, Malawi, Mozambique, Zambie, Zimbabwe	Résultats attendus en 2022

Tableau 3 : Essais vaccinaux contre le VIH de phase II/III (Adapté de (Lelièvre and Lévy 2016)).

HVTN : HIV Vaccine Trials Network

Les sous-types de VIH-1 des protéines utilisées dans les différents essais vaccinaux sont indiqués entre parenthèses.

C. Réponse immunitaire des patients contrôleurs

Différentes réponses immunitaires cellulaires ou humorales semblent jouer un rôle dans le contrôle de l'infection observé chez les patients HIC et les LTNP.

1. Réponses cellulaires particulièrement efficaces chez certains patients HIC

Plusieurs types de réponses cellulaires sont impliqués dans la réponse efficace observée chez certains patients HIC :

- Réponse lymphocyte T CD8⁺ :

De façon remarquable, les HIC sont capables d'exposer une forte réponse cellulaire lymphocytes T CD8⁺ spécifique du VIH, avec une activité suppressive du virus permettant de contrôler la charge virale (Migueles et al. 2002; Sáez-Cirión et al. 2009). Les lymphocytes T CD8⁺ jouent donc un rôle crucial dans la détermination de la vitesse de progression vers la maladie.

De plus, une étude récente a montré que les HIC sont capables d'induire de fortes réponses immunitaires spécifiques du VIH, tout en maintenant de faibles niveaux d'inflammation (Hocini et al. 2019). En effet, les auteurs ont montré une augmentation de l'activation des lymphocytes T et une modulation négative des gènes inflammatoires dans le sang des patients HIC, en comparaison à des patients traités. Les réponses cellulaires spécifiques du VIH des patients HIC étaient également associées à une faible expression des gènes inflammatoires et à des réponses lymphocytes Th1 et cytotoxiques.

L'expression de certains allèles HLA de classe I tels que HLA-B*57, HLA-B*27 et HLA-B*81 a été associée au contrôle du VIH observée chez les HIC (Almeida et al. 2007, 2009; Kosmrlj et al. 2010; Ladell et al. 2013). Cette protection est due à des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques avec des fonctions effectrices particulièrement efficaces, incluant la reconnaissance de variants d'échappements du VIH-1 (Sáez-Cirión et al. 2007; Iglesias et al. 2011; Chen et al. 2012; Ladell et al. 2013). Certaines réponses lymphocyte T CD8⁺ protectrices sont associées à des clonotypes particuliers de TCR, responsables des puissantes fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺, caractéristiques du contrôle du VIH-1 chez les individus asymptomatiques porteurs de l'allèle HLA-B*57 et/ou HLA-B*27 (Chen et al. 2012; Ladell et al. 2013).

- Réponse lymphocyte T CD4⁺ :

Plusieurs études ont démontré que la réponse lymphocyte T CD4⁺ participe au contrôle du VIH-1 observé chez les HIC (Kaufmann et al. 2007; Sacha et al. 2009; Soghoian et al. 2012; Johnson et al. 2015; Benati et al. 2016). En effet, bien qu'une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ soit rapidement observée chez les patients chroniques, les lymphocytes T CD4⁺ persistent avec une forte capacité proliférative chez les patients HIC. Les traitements antirétroviraux peuvent restaurer les taux de CD4⁺ au cours du temps, mais seuls les lymphocytes T CD4⁺ des HIC conservent leur capacité de différenciation en lymphocytes T *helper* 1 (Th1) malgré le faible taux d'antigènes VIH-1 présent (Vingert et al. 2010, 2012). Certains allèles HLA de classe II tels que HLA-DRB1*15:02 ou HLA-DRB1*13:01 ont été associés à une progression plus lente vers la maladie (Malhotra et al. 2001; Ferre et al. 2010; Ranasinghe et al. 2013).

Une équipe a également montré qu'une réponse lymphocyte T CD4⁺ de forte affinité dirigée contre le domaine le plus immuno-dominant de la capsid du VIH-1 (Gag293) était associée au contrôle du VIH-1 (Vingert et al. 2010; Benati et al. 2016). Les lymphocytes T CD4⁺ des HIC présentent donc des récepteurs aux lymphocytes T (TCR) de haute affinité et l'épitope reconnu est présenté par de nombreuses molécules du CMH de classe II. De plus, ils ont montré récemment que ces TCR de haute affinité promouvaient la formation de synapses virologiques et conféraient des capacités cytotoxiques à la fois aux lymphocytes T CD4⁺ et aux lymphocytes T CD8⁺ (Galperin et al. 2018).

Cependant, ces réponses cellulaires particulièrement efficaces ne sont pas détectées chez tous les HIC, suggérant que d'autres réponses immunitaires participent au contrôle de l'infection observé chez ces patients.

2. Réponse humorale des HIC

a. Lymphocytes B mémoires préservés

Les patients HIC présentent une proportion plus importante de lymphocytes B RM et AM, en comparaison aux patients infectés par le VIH non contrôleurs (Pensiero et al. 2013).

b. Induction d'anticorps neutralisants variable selon les patients

Les études concernant les activités neutralisantes des patients HIC sont controversées. Plusieurs études démontrent que les sérums des patients HIC présentent de plus faibles activités neutralisantes que celles retrouvées dans des prélèvements de patients avec des charges virales élevées tandis que d'autres études rapportent de fortes activités neutralisantes pour les HIC (Bailey et al., 2006; Lambotte et al., 2009; Pereyra et al., 2008; Sajadi et al., 2011; González et al., 2018).

En fait, les activités neutralisantes sont détectées de façon très hétérogène parmi cette population, avec certains patients HIC présentant de fortes activités neutralisantes à large spectre (contre plusieurs souches virales), suggérant que le contrôle de l'infection observé chez ces patients pourrait être attribué à différents facteurs incluant une réponse anticorps particulièrement efficace.

c. Implication des activités médiées par le domaine Fc dans le contrôle viral des patients HIC

Une étude récente a montré que les HIC développant des activités neutralisantes démontraient de plus fortes activités d'ADCP et d'ADCD que les HIC n'ayant pas d'activités neutralisantes, alors qu'aucune différence n'a été observée pour les activités ADCC (Lofano et al. 2018). Les anticorps de ces patients se liaient plus fortement aux récepteurs Fc ainsi qu'aux récepteurs du complément et leurs domaines Fc étaient fortement sialylés. Par ailleurs une autre étude a montré que le profil d'activités médiées par le domaine Fc des anticorps tôt après l'infection prédisait le développement d'anticorps neutralisants à large spectre chez des patients non contrôleurs (Richardson et al. 2018). Il paraît donc essentiel de poursuivre ces études du rôle des anticorps chez les patients HIC.

De façon intéressante, il a été montré que l'activité d'ADCC pourrait participer au contrôle de l'infection observée chez les HIC. En effet, une étude a montré de plus forts taux d'ADCC chez les HIC que chez des personnes avec des charges virales élevées (Lambotte et al. 2009). De plus, cette activité était supérieure chez les HIC HLA-B*57-, en comparaison aux HIC HLA-B*57+ (Lambotte et al. 2013).

Enfin, une étude récente a identifié par spectrométrie de masse des sous-populations de

cellules NK qui différenciaient les patients HIC des patients non contrôleurs (Pohlmeyer et al. 2019). Il serait donc intéressant d'analyser les fonctions effectrices de cette sous-population CD11b⁺CD57⁺CD161⁺Siglec-7⁺ des cellules NK CD56^{dim}CD16⁺, qui sont plus abondantes chez les patients HIC et qui pourraient donc participer au contrôle de l'infection observé chez ces patients.

3. Implication des sous-types d'IgG dans le contrôle viral des patients HIC et LTNP

80

Plusieurs études suggèrent l'implication des différents sous-types d'IgG dans le contrôle viral observé chez les patients HIC et LTNP :

- IgG1 :

Une étude a démontré que les patients HIC induisaient significativement plus d'IgG1 anti-p24 que des patients infectés de façon chronique (Banerjee et al. 2010).

Plus récemment, une étude a montré que les HIC développant des activités neutralisantes induisaient de plus forts taux d'IgG1 anti-gp120 que les HIC n'ayant pas d'activités neutralisantes, alors qu'aucune différence n'a été observée concernant les autres sous-types d'IgG (Lofano et al. 2018).

- IgG2 :

Une étude effectuée chez des patients LTNP, regroupés dans une cohorte française dénommée ALT (asymptomatiques à long terme), a déterminé par western blot les quantités des différents sous-types d'IgG dirigés contre les protéines du VIH-1 (Ngo-Giang-Huong et al. 2001). Une observation saisissante a été que les IgG2 anti-Env (particulièrement anti-gp41) étaient plus abondantes chez les personnes ne progressant pas vers la maladie. De façon très intéressante, seuls deux paramètres indépendants étaient corrélés avec la diminution de la progression de la maladie : la charge virale ou les IgG2 anti-gp41.

Une autre étude a confirmé que les IgG2 anti-gp41 étaient associées au contrôle de l'infection et a montré des taux supérieurs chez les HIC et plus particulièrement chez les HIC HLA-B*57-, en comparaison à des HIC HLA-B*57+ ou à des non contrôleurs (French et al. 2013). Au contraire, une étude plus récente a montré des taux plus élevés d'IgG2 spécifiques du VIH chez des patients chroniques en comparaison à des patients HIC (Sadanand et al. 2018).

- IgG3 :

Il a été montré que les sérums des HIC présentant de fortes activités antivirales polyfonctionnelles étaient enrichis en sous-type IgG1 et IgG3 (Ackerman et al. 2016). De plus, une étude récente a montré que les patients non contrôleurs présentent une augmentation des taux d'IgG2 spécifiques du VIH au cours du temps, ainsi qu'une diminution d'IgG3 anti-VIH, contrairement aux patients HIC (Sadanand et al. 2018). Ceci suggère que les différences de proportions de sous-types d'IgG dans les sérums de personnes infectées par le VIH seraient la conséquence d'une variation au cours du temps.

Toutes ces études soulignent le rôle potentiel des sous-types d'IgG ainsi que du statut HLA-B*57 dans le contrôle de l'infection par le VIH-1 ou de la progression de la maladie.

A l'heure où le rôle clé des anticorps, neutralisants ou non neutralisants inhibiteurs, est avéré, il paraît maintenant essentiel d'analyser le rôle des différents sous-types d'IgG spécifiques du VIH et plus particulièrement chez des patients contrôleurs du VIH.

Objectifs du travail de thèse

Objectifs du travail de thèse

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

Objectifs du travail de thèse

Les anticorps induits par la réponse humorale lors de l'infection par le VIH ont démontré une multitude d'activités inhibitrices modifiant l'évolution du virus et sa réplication. Le traitement par des anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre a permis de protéger du VIH ou d'impacter sa réplication. Différentes études ont montré que des fonctions additionnelles impliquant le domaine Fc de ces anticorps jouent un rôle primordial dans cette inhibition, indiquant que la protection par les anticorps résulterait d'une combinaison subtile de multiples activités inhibitrices, susceptibles d'agir en synergie.

Le groupe très rare de personnes infectées capables de contrôler spontanément la réplication virale, dénommé *HIV controllers* (HIC), représente une source d'étude des plus intéressantes afin d'identifier différents isotypes d'immunoglobulines et différents mécanismes inhibiteurs des anticorps associés à ce contrôle.

L'objectif de ma thèse a ainsi été de caractériser finement la réponse isotypique et fonctionnelle des anticorps spécifiques du VIH-1 induits chez des patients contrôleurs, en comparaison à des patients chroniques non traités, évoluant vers la maladie. Cette étude m'a permis d'identifier un profil particulier d'anticorps induits chez les patients contrôleurs. Ce profil pourrait servir de base à l'induction d'anticorps fonctionnels par vaccination.

Mes travaux de thèse sont exposés sous forme de deux manuscrits publiés et d'un manuscrit en fin de rédaction, qui sera bientôt soumis à publication.

En annexe sont présentés des travaux publiés auxquels j'ai contribué au sein du laboratoire.

Matériel et méthodes

I. Cohortes

Les patients contrôleurs du VIH ou *HIV controllers* (HIC, n = 36) ont été recrutés dans la cohorte CO21 CODEX mise en place par l'ANRS. Les HIC y sont définis comme des patients infectés par le VIH maintenant des charges virales (CV) inférieures à 400 copies d'ARN du VIH/mL sans traitement antirétroviral pendant plus de cinq ans.

Les HIC ont été divisés en deux groupes en fonction de l'expression de l'allèle protecteur HLA-B*57 : HIC HLA-B*57+ (HIC B*57+, n = 17) ou HLA-B*57- (HIC B*57-, n = 19). Leurs charges virales médianes étaient respectivement de 30 et 2 copies/mL et leurs taux médians de lymphocytes T CD4⁺ étaient respectivement de 862 et 723 /mm³.

Les progresseurs chroniques ou *chronic progressors* (CP, n = 16) correspondent aux patients de la cohorte EP14, pour lesquels nous disposons de prélèvements historiques collectés en 2000, alors que le traitement antirétroviral n'était pas systématiquement débuté dès la détection du VIH.

Ces personnes infectées avec une médiane de six ans démontraient un niveau raisonnable de lymphocytes T CD4⁺ (médiane de 696 /mm³ au moment du prélèvement sanguin) malgré une charge virale élevée (médiane de 10 250 copies/mL). Ces patients ont, par la suite, bénéficié d'un traitement.

Tous les sujets ont donné leur consentement écrit et éclairé pour l'utilisation de leurs échantillons de sang à des fins de recherche.

La cohorte CO21 CODEX et cette sous-étude ont été approuvées par le Comité d'éthique d'Ile de France VII.

L'étude a été menée conformément aux principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki.

II. Purification des IgG3 et IgG1,2,4

Les IgG3 et IgG1,2,4 sont purifiés sur le principe de la chromatographie d'affinité, par l'utilisation successive de deux colonnes différentes.

Purification des immunoglobulines G : les IgG sont purifiées à partir des sérums de patients en utilisant des colonnes de protéine G Sépharose™ 4 Fast Flow (Thermo Scientific).

Purification des sous-types d'immunoglobulines G : les IgG3 sont séparées de la fraction contenant les IgG purifiées par passage sur une colonne de protéine A Sépharose™ 4 Fast Flow (Thermo Scientific), la protéine A ne retenant pas les IgG3 humaines. Ceci permet donc de séparer les IgG3 des IgG1,2,4.

La procédure de purification est identique pour les deux types de colonnes : 5 mL de sérum ou les 25 mL de la fraction IgG sont déposés respectivement sur 10 mL de protéine G Sépharose™ 4 Fast Flow ou de protéine A Sépharose™ 4 Fast Flow. Puis, des lavages au PBS (Phosphate Buffered Saline) (Gibco) sont effectués (Fraction (F) 1 à 3). Un tampon glycine pH 4 puis pH 2,7 est ensuite ajouté afin de diminuer progressivement le pH (F4 et F4). Enfin, la fraction retenue sur la colonne est éluée par le tampon glycine pH 2,7 et le pH est immédiatement ajusté à 7 (F6). Un dernier lavage au PBS est ensuite effectué afin de vérifier que toute la fraction fixée sur la colonne a été récupérée (F7).

III. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

A. Dosage des IgA totales et spécifiques du VIH

Le dosage des IgA totales, IgA anti-gp41 et IgA anti-gp140 est fait par un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Les IgA totales sont capturées par fixation d'un anticorps de mouton anti-IgA humaine (1 µg/mL dans du tampon carbonate 1X) (The Binding Site), les IgA anti-gp41 par fixation de l'antigène gp41S30 (Krell et al. 2004) (2 µg/mL dans du tampon carbonate 1X) et les IgA anti-gp140 par fixation de l'antigène gp140Yu2b (Lorin and Mouquet 2015) (2 µg/mL dans du tampon carbonate 1X) (fournis par Hugo Mouquet de l'Institut Pasteur de Paris) sur une plaque 96 puits MAXISORP (Sigma) pendant la nuit à 4 °C.

Après une étape de blocage (BSA (*bovine serum albumin*)) 5 % dans du PBS (Gibco)) pendant 2 heures à 37 °C, les sérums sont dilués dans du PBS (dilutions au 1/50 000 et 1/250 000 pour les IgA totales et au 1/1000 et 1/10 000 pour les IgA anti-gp41 et anti-gp140) puis sont ajoutés et incubés pendant 2 heures à 37 °C.

Matériel et méthodes : ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Un anticorps de chèvre anti-IgA humaine couplé à la HRP (*horseradish peroxidase*) dilué au 1/5000 (PBS, BSA 5 %) (Southern Biotech) est ensuite ajouté puis incubé pendant 1 heure à 37 °C.

Enfin, 100 µL de substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) (KPL) est ajouté avant une lecture en cinétique. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la réaction est arrêtée par de l'acide sulfurique (25 µL de H₂SO₄ 1 M par puits) et la densité optique en point final est lue à 450 nm (référence 650 nm).

Les concentrations en IgA totales sont calculées grâce à une gamme de concentrations établie avec un sérum de référence.

B. Dosage des IgG totales et spécifiques du VIH

Le dosage des IgG totales, IgG anti-gp41 et IgG anti-gp140 est réalisé de la même façon. La capture des IgG totales se fait par fixation d'un anticorps de mouton anti-IgG humaine (The Binding Site) et la détection des IgG spécifiques du VIH par fixation de l'antigène gp41S30 ou gp140Yu2b (0,5 µg/mL dans du tampon carbonate 1X). Les sérums sont dilués au 1/500 000 et 1/2 500 000 pour les IgG totales et au 1/10 000 et 1/100 000 pour les IgG spécifiques du VIH. Un anticorps de chèvre anti-IgG humaine couplé à la HRP est utilisé pour la détection des IgG totales et spécifiques du VIH.

Les concentrations en IgG totales sont calculées grâce à une gamme de concentrations établie avec un sérum de référence.

C. Dosage des IgG2 totales et spécifiques du VIH

Le dosage des IgG2 totales, IgG2 anti-gp41 et IgG2 anti-gp140 est réalisé de la même façon. La capture des IgG2 totales se fait par fixation d'un anticorps de mouton anti-IgG2 humaine (The Binding Site) et la détection des IgG2 spécifiques du VIH par fixation de l'antigène gp41S30 ou gp140Yu2b (5 µg/mL dans du tampon carbonate 1X). Les sérums sont dilués au 1/20 000 et 1/100 000 pour les IgG2 totales et au 1/10 et 1/100 pour les IgG2 spécifiques du VIH. Un anticorps de souris anti-IgG2 humaine couplé à la HRP est utilisé pour la détection des IgG2 totales et spécifiques du VIH.

Les concentrations en IgG2 totales sont calculées grâce à une gamme de concentrations, établie avec un sérum de référence.

D. Dosage des IgG3 totales et spécifiques du VIH

Le dosage des IgG3 totales, IgG3 anti-gp41 et IgG3 anti-gp140 est réalisé de la même façon. La capture des IgG3 totales se fait par fixation d'un anticorps de souris anti-IgG3 humaine (Clinisciences) et la détection des IgG3 spécifiques du VIH par fixation de l'antigène gp41S30 ou gp140Yu2b (5 µg/mL dans du tampon carbonate 1X). Les sérums sont dilués au 1/2000 et 1/10 000 pour les IgG3 totales et au 1/10 et 1/50 pour les IgG3 spécifiques du VIH. Un anticorps de souris anti-IgG3 humaine couplé à la HRP est utilisé pour la détection des IgG3 totales et spécifiques du VIH.

Les concentrations en IgG3 totales sont calculées grâce à une gamme de concentrations, établie avec un sérum de référence.

E. Calculs des ratios d'immunoglobulines spécifiques du VIH

Les ratios d'immunoglobulines spécifiques du VIH par rapport aux immunoglobulines totales ont été calculés pour chaque type et sous-type d'immunoglobuline à l'aide de cette formule :

$$\text{ratio DO} = \frac{\text{DO Ig anti-gp41 ou anti-gp140} \times \text{dilution sérum}}{\text{DO Ig totales} \times \text{dilution sérum}}$$

IV. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires

1. TZM-bl

Les cellules TZM-bl sont des cellules adhérentes issues de la lignée cellulaire cancéreuse HeLa. Elles expriment le CD4 et le CCR5 ainsi que le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle des régions LTR du VIH-1 (Platt et al. 1998).

L'entretien de ces cellules se fait tous les trois jours. Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² dans du milieu DMEM (*Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*) 1 g/L de glucose (Gibco) supplémenté à 10 % de SVF (sérum de veau fœtal) (Dutscher) et additionné de pénicilline (50 UI/mL) et de streptomycine (50 ng/mL) (Gibco). La première étape consiste à éliminer par aspiration le milieu de culture appauvri. Les cellules sont ensuite lavées avec 6 mL de PBS froid puis 3 mL de trypsine-EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) (Gibco) sont ajoutés de manière à recouvrir le tapis cellulaire. Après 1 minute à

température ambiante, la trypsine est partiellement éliminée et la boîte de culture est placée à l'incubateur à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 5 minutes afin de favoriser l'action de la trypsine. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 6 mL de milieu DMEM 10 % SVF frais. 1 mL de suspension cellulaire est repris dans une boîte de culture de 75 cm² avec 13 mL de milieu DMEM 10 % SVF. Les cellules sont finalement incubées à 37 °C, 5 % CO₂.

2. CEM.NKR.CCR5

Les cellules CEM.NKR.CCR5 (*cloned human T lymphoblastoid cell line* (T-LCL)) sont des cellules non adhérentes. Elles sont résistantes à la lyse par les cellules NK et expriment le corécepteur du VIH-1 CCR5 (Trkola et al. 1999).

L'entretien de ces cellules se fait tous les trois jours. Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² dans du milieu RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) (Gibco) supplémenté à 10 % de SVF (Dutscher) et additionné de pénicilline (50 UI/mL) et de streptomycine (50 ng/mL) (Gibco). 2 mL de suspension cellulaire sont dilués dans 13 mL de milieu RPMI 10 % SVF. Les cellules sont finalement incubées à 37 °C, 5 % CO₂.

3. 293T

Les cellules 293T (ou HEK293T) sont des cellules adhérentes. Il s'agit d'une lignée cellulaire humaine, dérivée de la lignée cellulaire HEK 293 (*human embryonic kidney 293 cells*), qui exprime une version mutante de l'antigène grand T du SV40 (DuBridge et al. 1987).

L'entretien de ces cellules se fait tous les trois jours sur le même principe que les TZM-bl. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (Gibco) supplémenté à 10 % de SVF (Dutscher) et additionné de pénicilline (50 UI/mL) et de streptomycine (50 ng/mL) (Gibco).

B. Cellules primaires

Isolement des cellules : les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cell*) sont isolées à partir de concentrés leucocytaires (*buffy coat*) de donneurs anonymes séronégatifs au VIH ainsi qu'au virus de l'hépatite C (HCV) provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Pour ce faire, la technique de sédimentation en gradient de Ficoll® est utilisée (Eurobio).

Le concentré leucocytaire est dilué au 1/4 dans du PBS Ca²⁺/Mg²⁺ (contenant 0,68 mM de CaCl₂ et 0,05 mM de MgCl₂) (Gibco), supplémenté en citrate au 1/100 (9 mM de tri-sodium citrate

dihydrate et 1,55 mM d'acide citrique monohydrate). Puis, 25 mL de cette dilution cellulaire sont déposés délicatement sur 20 mL de milieu de séparation (Ficoll®) de densité 1,078. Les tubes sont ensuite centrifugés 25 minutes à 1200 g et les cellules à l'interface sont prélevées puis lavées trois fois avec du PBS. Les cellules ainsi obtenues sont reprises dans 50 mL de PBS et comptées à l'aide d'une cellule de comptage KOVA® Glasstic® Slide (Hycor) après dilution au 1/10 dans du bleu de trypan.

Purification des cellules : les cellules sont purifiées à partir des PBMC par sélection positive. Cette technique permet de retenir les cellules exprimant une molécule de surface spécifique de la cellule (CD14 pour les monocytes). 10^9 PBMC sont incubées avec 500 µL d'anticorps dirigés contre la molécule de surface et couplés à des billes magnétiques (kit de sélection positive CD14 *microbeads human*, Miltenyi) et 5 mL de tampon MACS (autoMACS™ *running buffer*, Miltenyi) pendant 30 minutes à 4 °C. Les anticorps non spécifiques sont éliminés par un lavage dans du tampon MACS (PBS, BSA 0,5 %, EDTA 2 mM, pH 7,4). Les cellules sont ensuite déposées sur une colonne permettant de retenir les billes immuno-magnétiques ; les cellules non-marquées ne sont pas retenues. La fraction retenue dans la colonne, correspondant à la fraction positive, est ensuite éluée. L'appareil autoMACS Separator (AutoMACS; cycle PosselDS, Miltenyi Biotech) permet l'automatisation de ces différentes étapes. Cette technique permet d'obtenir les cellules sélectionnées avec un niveau de purification supérieur à 99,5 %.

Différenciation des cellules : les macrophages dérivés de monocytes (MdM) sont obtenus par différenciation des cellules souches purifiées (CD14⁺). Celle-ci est déclenchée par une incubation dans du milieu de différenciation : AIM V (Gibco) sans SVF, Glutamax 1X (Gibco) et GM-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) (100 U/mL) (R&D Systems) pour une période de cinq jours à 37 °C, 5 % CO₂. Les cellules sont congelées à une concentration de 50.10^6 cellules/mL.

V. Préparation du virus

Le VIH-1 étant un virus hautement pathogène, la manipulation de ce virus nécessite des conditions de sécurité particulières. La production de virus, la concentration de virus,

Matériel et méthodes : Préparation du virus

l'infection des cellules par le virus et les tests d'inhibition du virus par des anticorps s'effectuent dans les conditions de confinement d'un laboratoire de type BSL3 (*biosafety level 3*).

Caractéristiques des virus : les caractéristiques (nom, expérience dans laquelle ils ont été utilisés, sous-type viral, tropisme, virus transmis/fondateur (T/F) et niveau de neutralisation (tier)) des différents virus utilisés ont été détaillées dans le Tableau 4 ci-dessous.

Production des virus :

Pour le test de neutralisation du VIH-1 par les anticorps, des pseudovirus ont été produits en co-transfectant des cellules 293T avec le plasmide exprimant le gène *env* des souches de VIH-1 avec le plasmide contenant l'ADN viral de VIH-1 déficient en *env* : pSG3ΔEnv (**Tableau 4**).

Les clones moléculaires infectieux du VIH-1 (IMC pour *infectious molecular clone*) ont été produits par transfection de cellules 293T (**Tableau 4**).

Ces différentes souches ont été obtenues par le biais du programme AIDS *Research and Reference Reagent* (AIDS, NIAID, NIH).

Des IMC exprimant l'enveloppe virale et le gène rapporteur de la luciférase Renilla (IMC LucR) ont été également utilisés. Ces virus ont été obtenus par le Dr David Montefiori (Université de Duke, Etats-Unis) (**Tableau 4**).

Matériel et méthodes

	Nom	Expérience	Sous-type	Tropisme	Virus transmis/fondateur (T/F)	Niveau de neutralisation (tier)
Pseudovirus	SF162.LS	Neutralisation et neutralisation + phagocytose	B	R5	Non	1A
	BaL	Neutralisation	B	R5	Non	1B
	QH0692.42		B	R5	Non	2
	YU2		B	R5	Non	2
IMC	CH058		B	R5	Oui	2
	CH077		B	R5	Oui	2
	CH106		B	R5	Oui	2
	RHPA		B	R5	Oui	2
	THRO4156.18		B	R5	Oui	2
	REJO4541.67		B	R5	Oui	2
	TRJO4551.58		B	R5	Oui	3
	RHGA		B	R5	Non	2
IMC LucR	X1632_S2_B10	Neutralisation et lyse cellulaire (ADCC)	G	R5	Non	2
	TRO.11		B	R5	Non	2
	CE703010217_B6		C	R5	Non	2
	CH119.10		CRF07	R5	Non	2
	BJOX2000.03.2		CRF07	R5	Non	2
	CE1176_A3		C	R5	Non	2

Tableau 4 : Caractéristiques des virus utilisés pour les expériences de thèse.

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, CRF : circulating recombinant form, IMC : infectious molecular clone, IMC LucR : Renilla luciferase-expressing infectious molecular clone.

Amplification des virus : les virus sont amplifiés *in vitro* sur un mélange de PBMC provenant de plusieurs donneurs séronégatifs différents, préalablement stimulées avec de la PHA (phytohémagglutinine) (Moog, Fleury, et al. 1997; Holl, Peressin, Schmidt, et al. 2006). La production de virus est suivie par mesure de l'activité de la transcriptase inverse (RT) dans le surnageant de culture. Celui-ci est prélevé quotidiennement pendant la période de multiplication du virus. Les stocks de virus sont prélevés au pic de production et concentrés 70 fois avec un filtre de polyéthersulfone avec un seuil à 100 kDa (Centricon Plus-70 Biomax Filter ; Millipore).

VI. Tests de neutralisation du VIH par les anticorps

La neutralisation est déterminée par un test luciférase et les valeurs obtenues en RLU (*relative light unit* ou unité relative de lumière) sont exprimées en pourcentage du contrôle.

Les échantillons sont dilués dans du milieu DMEM 10 % SVF (sérum : dilutions au 1/20, 1/100 et 1/500 et immunoglobulines purifiées : dilutions à 0,2 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,003 mg/mL et 0,008 mg/mL) et 25 µL de ces dilutions sont déposées dans une plaque 96 puits et incubées pendant 1 heure à 37 °C avec 25 µL de virus dilué. 25 µL de TZM-bl à 4.10⁵ cellules/mL diluées dans du DMEM 10 % SVF + DEAE (diéthylaminoéthyle) Dextran (Sigma) à 37,5 µg/mL sont ensuite ajoutées. Après 36 heures, les cellules sont incubées 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec du Bright-Glo™ (système de dosage de la luciférase de luciole) (Promega) dilué au 1/2 dans de l'eau stérile. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 25 µL d'eau stérile et la luminescence est détectée par passage des plaques au luminomètre (PerkinElmer).

L'IRD50 ou l'IC50 sont respectivement définies comme étant la dilution inverse de l'échantillon ou la concentration de l'échantillon conduisant à une réduction de 50 % des RLU en pourcentage du contrôle.

VII. Test de neutralisation et de phagocytose

Les sérum et immunoglobulines purifiés ont été testés pour leur capacité à neutraliser le VIH-1 en utilisant des macrophages dérivés de monocytes (Mdm) en tant que cellules cibles.

Matériel et méthodes : Test d'activité de lyse cellulaire (ADCC)

Les monocytes purifiés à partir de PBMC sont déposés dans des plaques 48 puits à 2.10^6 cellules/mL et cultivées avec du GM-CSF (dilution 1/10 000) dans du milieu AIM V pour obtenir des MdM. A trois jours de culture, les cellules sont lavées une fois avec du RPMI et après 5 à 8 jours de culture, les MdM sont utilisés pour l'infection.

Les échantillons sont dilués dans du milieu AIM V (sérum : dilutions au 1/20, 1/200, 1/2000 et 1/20 000 et immunoglobulines purifiées : dilutions à 0,2 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,003 mg/mL et 0,008 mg/mL) et mis en présence du virus SF162.LS pendant une heure. Le mélange échantillon/virus est ensuite déposé sur les MdM. Au bout de 36 heures, les MdM sont marqués pour la p24 intracellulaire (KC57-RD1-FITC; Beckman Coulter) avant passage au cytomètre.

L'IRD80 ou l'IC80 sont respectivement définies comme étant la dilution inverse de l'échantillon ou la concentration de l'échantillon conduisant à une réduction de 80 % du pourcentage de cellules infectées.

VIII. Test d'activité de lyse cellulaire (ADCC)

Le test ADCC a été réalisé en utilisant des PBMC purifiées en tant que cellules effectrices et des cellules de la lignée cellulaire CEM.NKR.CCR5 infectées par des IMC LucR (exprimant l'enveloppe virale et le gène rapporteur de la luciférase Renilla) (**Tableau 4**) en tant que cellules cibles.

Après quatre jours d'infection, les cellules CEM.NKR.CCR5 sont marquées pour la p24 intracellulaire (KC57-RD1-FITC; Beckman Coulter) et les expériences n'ont été réalisées que si au moins 10 % des cellules étaient infectées. 12 500 cellules CEM.NKR.CCR5 infectées par le VIH-1 sont déposées dans 12,5 μ L de RPMI-1640, 10 % de SVF et 50 UI d'IL-2 (systèmes de R & D) dans une plaque à 96 puits à fond en U et mélangées à 375 500 PBMC dans 12,5 μ L du même milieu (ratio cellule effectrice/cellule cible 30/1). 25 μ L des échantillons dilués (sérum : dilutions au 1/50, 1/500, 1/5000 et 1/50 000 et immunoglobulines purifiées : dilutions à 0,2 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,003 mg/mL et 0,008 mg/mL) sont ajoutés. Quatre heures plus tard, 25 μ L de substrat VivirenTM (système de dosage de la luciférase Renilla) (Promega) à 60 μ M sont ajoutés et l'intensité de luminescence générée par les cellules cibles

non lysées par les anticorps médiant l'ADCC présents dans les échantillons est détectée par passage des plaques au luminomètre (PerkinElmer).

Le pourcentage de lyse des cellules cibles est normalisé par rapport aux puits sans anticorps en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de lyse} = \left(\frac{\text{RLU cellules infectées et effectrices} - \text{RLU cellules infectées et effectrices et échantillons}}{\text{RLU cellules infectées et effectrices}} \right) \times 100$$

Ceci prend en compte la diminution du taux d'infection due à la lyse directe en l'absence d'anticorps provenant des échantillons.

L'aire sous la courbe ou *area under the curve* (AUC) a été calculée sur une plage de dilutions en utilisant la méthode trapézoïdale et a été tronquée au-dessus de zéro.

IX. Cytométrie en flux

Elle permet de caractériser la taille, la granulosité et la fluorescence des cellules préalablement marquées par des anticorps fluorescents spécifiques des différents déterminants choisis. L'acquisition des résultats est réalisée sur un cytomètre LSRII (BD Biosciences), calibré par des billes CST (*cytometer setup and tracking*, BD Biosciences) pour assurer la qualité et la cohérence des mesures entre les différentes expériences. La compensation entre les différents fluorochromes choisis est réalisée en utilisant le kit CompBeads (BD Biosciences).

Le marquage membranaire et intracellulaire permet de déterminer l'intensité et le pourcentage de cellules positives pour des marqueurs donnés par rapport aux contrôles. Les débris cellulaires sont exclus grâce aux paramètres *forward scatter* et *side scatter*. Les doublets cellulaires sont exclus grâce aux paramètres *forward scatter width* et *forward scatter area* et les cellules mortes sont exclues par le marquage Live/Dead. L'analyse des résultats est effectuée sur le logiciel FACS DiVa Version 6.1.2 (BD, Biosciences).

X. Diagramme en radar

Le diagramme en radar ou *radar chart* montre une représentation descriptive des profils d'anticorps des patients HIC et chroniques. Il met en évidence la différence entre les différents groupes de patients selon les différentes caractéristiques de leurs réponses anticorps. Pour chaque groupe et chaque paramètre étudié, la médiane statistique a été utilisée comme valeur récapitulative. Le diagramme en radar a été dessiné à l'aide de la bibliothèque fmsd R (<https://cran.r-project.org/web/packages/fmsb>).

XI. Analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA)

Afin d'identifier les caractéristiques des anticorps susceptibles d'expliquer les différences entre les différents groupes de patients, nous avons effectué une analyse discriminante à l'aide de PLS-DA (analyse discriminante des moindres carrés partiels ou *partial least-squares discriminant analysis*), un outil multivarié de réduction des dimensions (Pérez-Enciso and Tenenhaus 2003).

La représentation graphique des résultats obtenus avec PLS-DA est montrée avec les paramètres qui pourraient expliquer la séparation, du plus important en bas au moins important en haut. La contribution de chaque paramètre est représentée sous forme de graphique en barres dans lequel chaque longueur de barre correspond à l'importance (ou poids de chargement) du paramètre. Le poids de chargement peut être positif ou négatif. Ces caractéristiques supposées expliquer la séparation ont été sélectionnées à l'aide de sPLS-DA (analyse discriminante par les moindres carrés partiels éparpillés ou *sparsed partial least-squares discriminant analysis*) (Lê Cao, Boitard, and Besse 2011). Afin d'obtenir une estimation précise, nous avons utilisé un schéma de validation croisée de cinq fois, répété 50 fois, conduisant à un taux d'erreur de classification global de 15 %.

XII. Analyses statistiques

Les comparaisons entre groupes sont analysées à l'aide d'un test bilatéral de Mann-Whitney. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives (* :

Matériel et méthodes : Analyses statistiques

$p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$). Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA).

Les associations entre variables continues ont été évaluées à l'aide d'un test de corrélation de Spearman à l'aide du package R «Visualisation d'une matrice de corrélation», version 0.77 (<https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>).

Résultats

Résultats

Publication 1

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

Résultats

Une forte fréquence de lymphocytes T auxiliaires folliculaires spécifiques du VIH est associée à la préservation des réponses lymphocytes B mémoires chez les patients contrôleurs du VIH

A High Frequency of HIV-Specific Circulating Follicular Helper T Cells Is Associated with Preserved Memory B Cell Responses in HIV Controllers

Mathieu Claireaux, Moran Galperin, Daniela Benati, Alexandre Nouël, Madhura Mukhopadhyay, **Jérôme Klingler**, Pierre de Truchis, David Zucman, Samia Hendou, Faroudy Boufassa, Christiane Moog, Olivier Lambotte, Lisa A. Chakrabarti

mBio, 2018

Les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh pour *follicular helper T cells*) jouent un rôle essentiel dans la maturation d'affinité de la réponse anticorps en fournissant une aide aux lymphocytes B. Pour déterminer si ce sous-ensemble de lymphocytes T CD4⁺ pouvait contribuer au contrôle spontané de l'infection par le VIH observé chez les HIC, le laboratoire de L. Chakrabarti a analysé le phénotype et la fonction des Tfh circulants (cTfh) chez des patients HIC (cohorte CO21 CODEX de l'ANRS, n = 15) en comparaison à des patients traités avec de faibles charges virales similaires (n = 15).

Dans cette étude, j'ai effectué des tests ELISA de détection des IgG totales et spécifiques du VIH dans les sérums des patients HIC et des patients traités, montrant que la concentration en anticorps spécifiques du VIH ne permettait pas de distinguer clairement les deux groupes. J'ai également analysé la capacité des sérums de patients HIC et des patients traités à neutraliser deux souches virales tier-1, six souches T/F tier-2 et une souche T/F tier-3, ainsi que la souche du virus de la leucémie murine (MLV) en tant que témoin négatif. Ces données ont montré que les capacités de neutralisation étaient dans l'ensemble faibles chez les contrôleurs du VIH.

Les cTfh spécifiques du VIH (Tet⁺) ont été détectés par le marquage du tétramère Gag du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) dans la population de lymphocytes T CD45RA⁻ CXCR5⁺ CD4⁺ et se sont avérés être plus fréquents dans le groupe des patients HIC (p = 0,002). La fréquence d'expression de PD-1 dans les cTfh Tet⁺ était augmentée dans les

deux groupes de patients (médiane, > 75 %) par rapport aux cTfh totales (< 30 %), mais l'intensité de l'expression de PD-1 par cellule est restée plus élevée dans le groupe des patients traités ($p = 0,02$), indiquant la persistance d'une activation immunitaire anormale chez les patients traités. La fonction des cTfh, analysée par la capacité à promouvoir la sécrétion d'IgG dans des co-cultures avec des lymphocytes B mémoires autologues, n'a pas montré de différences majeures entre les deux groupes de patients en termes de production d'IgG totales, mais s'est révélée significativement plus efficace dans le groupe des patients HIC dans le cas de la mesure de la production d'IgG spécifiques du VIH. La fréquence des cTfh Tet⁺ était corrélée à la production d'IgG spécifiques du VIH ($R = 0,71$ pour les IgG anti-Gag et $R = 0,79$ pour les IgG anti-Env, respectivement).

Ces résultats montrent pour la première fois les interactions clés entre les lymphocytes cTfh et les lymphocytes B sont préservées chez les patients contrôleurs, ce qui entraîne de puissantes réponses lymphocytes B mémoires qui pourraient jouer un rôle encore sous-estimé dans le contrôle de l'infection par le VIH.



RESEARCH ARTICLE



A High Frequency of HIV-Specific Circulating Follicular Helper T Cells Is Associated with Preserved Memory B Cell Responses in HIV Controllers

109

M. Claireaux,^{a,b} M. Galperin,^{a,b} D. Benati,^{a,b,*} A. Nouël,^{a,b} M. Mukhopadhyay,^{a,b} J. Klingler,^c P. de Truchis,^d D. Zucman,^e S. Hendou,^f F. Boufassa,^g C. Moog,^g O. Lambotte,^{g,h,i,j} L. A. Chakrabarti^{a,b}

^aPasteur Institute, Viral Pathogenesis Unit, Paris, France

^bINSERM U1108, Paris, France

^cINSERM UMR_S1109, Center for Research in Immunology and Hematology, Medicine Faculty, Strasbourg Translational Medicine Federation (FMTS), Strasbourg University, Strasbourg, France

^dAP-HP, Infectious and Tropical Diseases Department, Raymond Poincaré Hospital, Garches, France

^eHIV Unit, Foch Hospital, Suresnes, France

^fINSERM U1018, Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), Le Kremlin-Bicêtre, France

^gINSERM U1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, Le Kremlin-Bicêtre, France

^hAP-HP, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, University Hospital Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

ⁱUniversité Paris Sud, UMR1184, Le Kremlin-Bicêtre, France

^jCEA, DSV/MET, Division of Immuno-Virology, IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France

ABSTRACT Follicular helper T cells (T_{fh}) play an essential role in the affinity maturation of the antibody response by providing help to B cells. To determine whether this CD4⁺ T cell subset may contribute to the spontaneous control of HIV infection, we analyzed the phenotype and function of circulating T_{fh} (cT_{fh}) in patients from the ANRS CO21 CODEX cohort who naturally controlled HIV-1 replication to undetectable levels and compared them to treated patients with similarly low viral loads. HIV-specific cT_{fh} (Tet⁺), detected by Gag-major histocompatibility complex class II (MHC-II) tetramer labeling in the CD45RA⁺ CXCR5⁺ CD4⁺ T cell population, proved more frequent in the controller group ($P = 0.002$). The frequency of PD-1 expression in Tet⁺ cT_{fh} was increased in both groups (median, >75%) compared to total cT_{fh} (<30%), but the intensity of PD-1 expression per cell remained higher in the treated patient group ($P = 0.02$), pointing to the persistence of abnormal immune activation in treated patients. The function of cT_{fh}, analyzed by the capacity to promote IgG secretion in cocultures with autologous memory B cells, did not show major differences between groups in terms of total IgG production but proved significantly more efficient in the controller group when measuring HIV-specific IgG production. The frequency of Tet⁺ cT_{fh} correlated with HIV-specific IgG production ($R = 0.71$ for Gag-specific and $R = 0.79$ for Env-specific IgG, respectively). Taken together, our findings indicate that key cT_{fh}-B cell interactions are preserved in controlled HIV infection, resulting in potent memory B cell responses that may play an underappreciated role in HIV control.

IMPORTANCE The rare patients who spontaneously control HIV replication in the absence of therapy provide a unique model to identify determinants of an effective anti-HIV immune response. HIV controllers show signs of particularly efficient antiviral T cell responses, while their humoral response was until recently considered to play only a minor role in viral control. However, emerging evidence suggests that HIV controllers maintain a significant but "silent" antiviral memory B cell population that can be reactivated upon antigenic stimulation. We report that cT_{fh} help likely

Received 7 February 2018 Accepted 16 April 2018 Published 8 May 2018

Citation Claireaux M, Galperin M, Benati D, Nouël A, Mukhopadhyay M, Klingler J, de Truchis P, Zucman D, Hendou S, Boufassa F, Moog C, Lambotte O, Chakrabarti LA. 2018. A high frequency of HIV-specific circulating follicular helper T cells is associated with preserved memory B cell responses in HIV controllers. *mBio* 9:e00317-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00317-18>.

Invited Editor Viviana Simon, Icahn School of Medicine at Mount Sinai

Editor Peter Palese, Icahn School of Medicine at Mount Sinai

Copyright © 2018 Claireaux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to L. A. Chakrabarti, chakra@pasteur.fr.

* Present address: D. Benati, Center for Regenerative Medicine Stephano Ferrari, Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy.

May/June 2018 Volume 9 Issue 3 e00317-18

mbio.asm.org 1

Clairaux et al.



contributes to the persistence of controller memory B cell responses, as the frequency of HIV-specific cTfh correlated with the induction of HIV-specific antibodies in functional assays. These findings suggest that T follicular help may contribute to HIV control and highlight the need for inducing such help in HIV vaccine strategies that aim at eliciting persistent B cell responses.

KEYWORDS B lymphocytes, HIV controllers, MHC-II tetramers, T follicular helper, T lymphocytes, human immunodeficiency virus

Follicular helper T cells (Tfh) were identified in 2000 as the key helper CD4⁺ T cell population responsible for providing help to B cells (1, 2). Tfh are required for the maturation of high-affinity antibodies against T-cell-dependent antigens and for the development of germinal centers (GC), both in mice and humans (for reviews, see references 3 to 5). The Tfh form conjugates with B cells through cognate interactions dependent on T cell receptor (TCR)/peptide-major histocompatibility complex class II (MHC-II) antigen recognition and of costimulatory molecules. These interactions are needed to trigger immunoglobulin (Ig) class switching and are at the core of the selection process that promotes the survival of high-affinity Ig-producing B cells. Tfh can be identified by the expression of the CXCR5 chemokine receptor, which drives their localization to GC, and by a high expression of the regulatory marker PD-1, which may reflect ongoing activation through the TCR (1, 2). Tfh provide help to B cells through a series of costimulatory molecules (CD40L, ICOS, SLAM, CD28, OX40, and BTLA) and by secreting the cytokine interleukin-21 (IL-21) (4, 6). A defining transcription factor of the Tfh population is Bcl-6, which is required for high CXCR5 expression (7), though Bcl-6 needs to act in concert with a series of other transcription factors such as c-Maf, Asc12, IRF4, BATF, and TCF-1 to confer full Tfh function (8–11). Tfh differentiation is finely regulated and not binary, as Tfh can show a degree of plasticity and share differentiation markers with other T helper types (12).

The circulating population of CXCR5⁺ CD4⁺ T cells, which represents about 10 to 15% of the blood CD4⁺ T cell pool in humans, was shown to share functional characteristics with Tfh that reside in lymphoid tissues. In particular, blood CXCR5⁺ CD4⁺ T cells have the capacity to provide help to B cells and promote IgG and IgA secretion in CD4/B cell coculture assays, thus demonstrating bona fide Tfh function (13, 14). These cells, termed circulating Tfh, or cTfh, are phenotypically distinct from the Tfh found in GC, with a low expression of costimulatory markers such as ICOS and PD-1 and of the transcription factor Bcl-6. The cTfh population is in a more resting state than GC Tfh, but there are indications that cTfh reacquire typical Tfh markers such as Bcl-6, ICOS, and PD-1 after *in vitro* activation (14) or *in vivo* reactivation following vaccination (15). Whether cTfh represent short-lived effector Tfh recently released from lymphoid organs or long-lived recirculating memory Tfh is still debated (16). However, there is a clear link between the circulating and lymphoid Tfh populations as both are increased in human and murine models of autoimmunity (17, 18). In addition, activated cTfh increase in frequency at peak response after influenza vaccination and correlate in frequency with the titers of the specific antibody response (15, 19). Recently, PD-1⁺ cTfh were shown to be clonally related to tonsillar GC Tfh through TCR clonotypic analysis, establishing the link between the two populations (20). In the same study, activated ICOS⁺ PD-1⁺ cTfh induced upon HIV (human immunodeficiency virus) vaccination were found to be clonally related to the resting PD-1⁺ cTfh population detected postvaccination, suggesting that cTfh persist as circulating memory cells in humans (20). In addition, a recent study in mice showed that GC Tfh could be released from lymphoid organs to the circulation upon blocking interactions with cognate antigens, revealing a dynamic exchange between the lymphoid and circulating Tfh pools (21). Of note, HIV-specific cTfh defined by IL-21 production were induced at higher levels by the partly efficacious RV144 HIV vaccine than by other candidate HIV vaccines that had shown no efficacy, suggesting a key role for the Tfh response in inducing protective antibodies directed at HIV (22). Recent studies have also reported an association between the proportion of

May/June 2018 Volume 9 Issue 3 e00317-18

mbio.asm.org 2

PD-1⁺ cTfh or PD-1⁺ CXCR3⁺ cTfh and the induction of broadly neutralizing antibodies in HIV-infected patients, pointing to the relevance of cTfh studies for understanding the development of efficient antibody responses in the context of a chronic viral infection (23, 24).

Though Tfh help is thought to be essential to the maturation of antiviral humoral responses, Tfh also seem to contribute to HIV pathogenesis, through the promotion of abnormal B cell activation and HIV replication. The frequency of Tfh cells is markedly increased in lymph nodes of patients with progressive HIV infection (25, 26), in a context where other CD4⁺ T cell subsets show exhaustion and depletion. A possible reason may be that Tfh preferentially differentiate in situations of high antigenemia, when they receive strong and persisting signals through the TCR (27, 28). This notion is compatible with the observation that Tfh abundance generally increases in chronic, nonresolving viral and bacterial infections (4). Increases in IL-6 levels, which are a hallmark of abnormal immune activation, may also contribute to Tfh amplification (29). The predominance of Tfh helps explain the lymph node hyperplasia and the nonspecific hypergammaglobulinemia that are characteristic of progressive HIV and SIV (simian immunodeficiency virus) diseases. The frequency of HIV-specific cells among the Tfh population appears quite high, with median values of Gag-specific cells above 1% in viremic patients (25, 26), suggesting that HIV directly contributes to the amplification of Tfh responses. Importantly, Tfh also represent a major reservoir of HIV- or SIV-infected CD4⁺ T cells within lymphoid organs, with a higher viral DNA content than other CD4⁺ T cell subsets (26, 29–31). An intrinsically higher susceptibility of Tfh to HIV infection, possibly due to the repression of antiviral resistance genes by Bcl-6, could account for the high Tfh infection rate (26, 32). The scarcity of cytotoxic CD8⁺ T cells that traffic to GC may also limit the elimination of infected Tfh (33). Studies in the SIV model suggest that GC constitute viral sanctuaries even in macaques that naturally control viral replication in the periphery (34). Tfh also remain the most prominent HIV reservoir in lymph nodes of treated patients after viremia suppression, which poses a major obstacle to viral eradication (35, 36).

Several lines of evidence suggest that Tfh function is suboptimal in progressive HIV and SIV infections. Multiple studies have shown that the development of antibody responses to vaccines or other pathogens is impaired in HIV-infected patients (37, 38). For instance, the proportion of nonresponders to influenza vaccination is higher among HIV-infected individuals, and cTfh capacity to promote the secretion of influenza virus-specific antibodies by memory B cells appears impaired in the nonresponders (15). Mechanistically, negative regulation via the PD-1/PD-L1 axis has been proposed to play a role in Tfh dysfunction, as memory B cells from HIV-infected patients showed overexpression of the PD-L1 ligand, which limited functional responses in cognate PD-1hi Tfh (39). Increased PD-L1 expression by dendritic cell (DC)-like cells has also been reported in the lymph nodes of macaques with progressive SIV infection, suggesting that abnormal PD-L1 expression may also perturb the priming of Tfh by antigen-presenting cells (33). The facts that memory B cells show signs of impaired differentiation in progressive HIV infection and that HIV-specific memory B cells in particular appear depleted in patients with advanced infection are compatible with a loss of Tfh help (38, 40). In addition, the antibody response directed at HIV shows clear signs of impairment. A key observation is that antibodies able to efficiently neutralize autologous HIV strains take about 2 to 3 years to emerge in most patients (41, 42). These antibodies do not appear to bring much clinical benefit to patients, as HIV repeatedly and continuously escapes the antibody response through Env mutations (43). Antibodies able to neutralize a large spectrum of HIV variants, the so-called broadly neutralizing antibodies (bNAbs), occur only rarely (42, 44). Importantly, sequencing of Ig variable regions showed that bNAbs are highly hypermutated and hence highly dependent on Tfh help (44, 45). This suggests that the consecutive cycles of B cell-Tfh interactions required for extensive somatic hypermutation of anti-HIV antibodies are impaired or interrupted in most patients with progressive HIV disease.

HIV controllers (HC), also called elite controllers, are rare patients who spontane-

ously control HIV replication in the absence of antiretroviral therapy (46, 47). Fewer than 0.5% of HIV-1-seropositive individuals maintain a controller status, as defined by a viral load of <50 copies of HIV-1 RNA/ml over 5 years, but these individuals have a very low risk of progression to AIDS (48). HIV controllers provide a unique model to elucidate the determinants of an efficient immune response directed at HIV. Multiple studies have documented that HIV controllers have a particularly efficient cellular immunity directed against HIV, with highly cytotoxic CD8⁺ T cells able to suppress viral replication in CD4⁺ target cells (49, 50), and polyfunctional CD4⁺ T cells endowed with high proliferative capacity and high antigen sensitivity (47, 51–53). In contrast, the possible contribution of the humoral arm of the immune response to HIV control has not been emphasized, as controllers do not harbor high neutralizing antibody titers (46). Multiple studies have demonstrated that the emergence of bNAbs requires relatively high viremia, high viral diversity, and multiple rounds of viral escape to emerge (41). While bNAbs are extremely promising tools for HIV prevention and immunotherapy, they seem to provide only limited benefit to the patients who naturally develop them, due to continuous viral escape (41, 43). In the absence of autologous virus neutralization, high bNAb titers may thus reflect the persisting but failing efforts of the humoral response at containing HIV replication and diversification. There are indications that anti-HIV antibody levels parallel HIV viremia in patients with low viral loads (54), suggesting that low NAb titers in HIV controllers may actually reflect efficient viral containment. However, interest in the involvement of the humoral response in HIV control has been revived, with the recent realization that HIV-specific memory B cell responses are actually strong in HIV controllers and are thus disconnected from circulating NAb titers. Analyses of memory B cells based on HIV-specific Ig production after restimulation in limiting dilution cultures or in B cell enzyme-linked immunosorbent spot assays (ELISpot) (40, 55–57) or on direct labeling with Env-derived protein probes (56) all revealed potent responses in HIV controllers, which surpassed those observed in treated patients or in viremic patients with advanced HIV infection. Thus, an emerging notion is that the preserved memory B cell population in HIV controllers has the capacity to transiently reactivate and produce NABs upon HIV replication episodes, which may contribute to the suppression of viremia.

Preserved Tfh function may help explain the persistence of a large HIV-specific memory B cell population in controlled HIV infection. To test this notion, we set out to characterize the HIV-specific cTfh population of HIV controllers using the MHC-II tetramer technology, which enabled a direct quantitation and phenotyping of this rare CD4⁺ T cell population without perturbations associated with *in vitro* culture. We compared HIV controllers with stringent viral control (<50 copies of HIV-1 RNA/ml) for over 5 years to patients who had received efficient antiretroviral therapy (ART) for over 5 years, ensuring that functional differences between the two groups would not result primarily from differences in viral antigen loads. This approach revealed that the HIV-specific cTfh population was more abundant in controllers and showed signs of chronic antigenic stimulation that remained lower than those seen in treated patients. Assays of Tfh function revealed an efficient induction of HIV-specific IgG in cTfh/memory B cell cocultures from controllers, while this response appeared defective for treated patients and could not be restored by cytokine supplementation. The frequency of HIV-specific cTfh correlated with IgG induction in the cocultures, supporting the notion of efficient cTfh-B cell interactions in controlled HIV infection.

RESULTS

The cTfh population displays a central memory phenotype with high PD-1 expression. In a first analysis, we characterized the frequency and phenotype of the total cTfh population from healthy donors (HD, $n = 8$), HIV controllers (HC group, $n = 10$), and treated patients (ART group, $n = 14$). Clinical characteristics of patient groups are reported in Table S1A in the supplemental material. The cTfh population was defined as the circulating CD3⁺ CD4⁺ CD45RA[−] CXCR5⁺ T cell subset among live lymphocytes (Fig. 1A). The gating strategy used and examples of "fluorescence minus

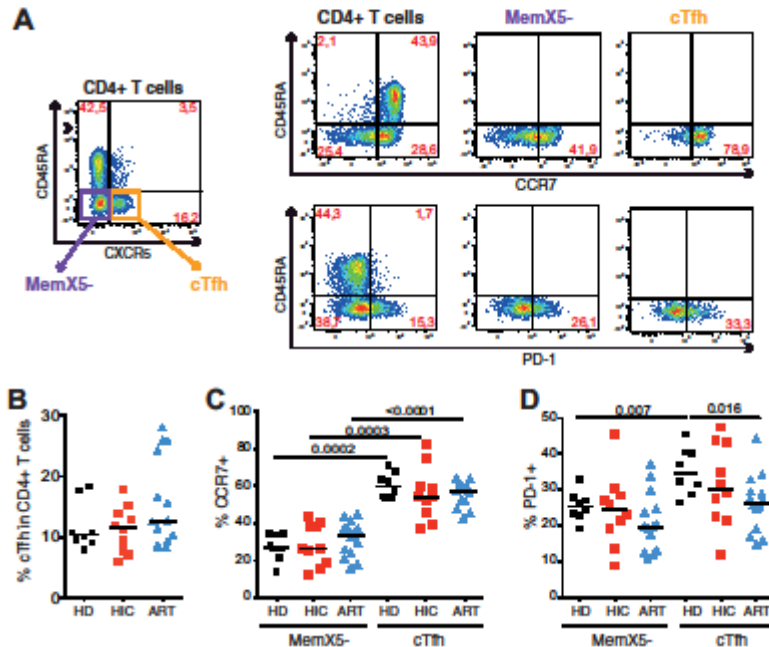


FIG 1 Phenotyping of the total cTfh population. Flow cytometry analysis of CD4⁺ T cells derived from healthy donors (HD, $n = 8$), HIV controllers (HIC, $n = 10$), and treated patients (ART, $n = 14$). (A) Representative plots depicting the gating of subsets analyzed in the CD4⁺ T cell population. (Left) CD4⁺ T cells were initially gated as viable CD3⁺ CD20⁻ CD14⁻ CD8⁻ CD4⁺ cells and were then analyzed for the following subsets: MemX5⁻ (CD45RA⁻ CXCR5⁻; purple square) and cTfh (CD45RA⁺ CXCR5⁺; orange square). The CD4⁺, MemX5⁻, and cTfh populations were then analyzed in relation to CD45RA and CCR7 expression (upper right panel) as well as CD45RA and PD-1 expression (lower right panel). (B) Comparison of the frequencies of cTfh in CD4⁺ T cells between healthy donor, HIV controller, and treated patient groups. (C and D) Comparison of the frequencies of CCR7⁺ (C) and PD-1⁺ (D) cells within the MemX5⁻ and cTfh subsets between healthy donor, HIV controller, and treated patient groups. Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained with the Mann-Whitney U test are reported.

one* (FMO) control labeling are reported in Fig. S1. The phenotype of cTfh was compared to that of memory CD4⁺ T cells that did not express the CXCR5 homing marker (MemX5⁻). Flow cytometry analysis showed that the cTfh population represented close to 10% of the circulating CD4⁺ T cell population, irrespective of the HIV infection status (Fig. 1B). No significant differences in cTfh frequencies were observed between the 3 groups, though a greater individual heterogeneity was noted in the ART group, with a few treated patients showing cTfh frequencies of >25%. The cTfh population showed a predominantly central memory phenotype in the 3 groups, as indicated by a high percentage of CCR7 expression (medians, 44% to 54% [Fig. 1C]), which was significantly higher than that observed in the MemX5⁻ population (medians, 26% to 33%). The cTfh population from healthy donors expressed higher levels of the PD-1 marker than the MemX5⁻ population (medians, 35% versus 25%, $P = 0.007$) (Fig. 1D), compatible with the high PD-1 expression characteristic of tissue Tfh (58). Patient cTfh also showed a trend for higher PD-1 expression than in the MemX5⁻ population, which did not reach significance due to higher intragroup variability (Fig. 1D). Taken together, the cTfh population did not show signs of major perturbations in these patients with efficiently controlled viremia.

Increased population of HIV-specific cTfh in HIV controllers. To characterize HIV-specific cTfh unperturbed by *in vitro* culture, we labeled them with MHC-II tetram-

ers. The study focused on CD4⁺ T cells specific for the most immunoprevalent epitope in the HIV-1 proteome, Gag293, located at positions 293 to 312 in the HIV-1 capsid. Responses to this CD4 epitope are exceptionally prevalent, as they can be detected in close to 50% of treated patients and in >70% of HIV controllers (59–61). The Gag293 epitope shows broad HLA-DR cross-restriction (53), which enables the study of patients with varied HLA genotypes. Patients included in the tetramer study expressed at least one of the 7 following HLA-DR alleles: DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0405, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1302, or DRB1*1502 (Table S1B and C). Labeling with the corresponding HLA-DR tetramers was performed on a minimum of 10⁷ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) per sample, to take into account the preferential depletion of HIV-specific CD4⁺ T cells in the course of progressive HIV infection (62). The gating strategy used to analyze Gag293-specific cells is represented in Fig. 2A and S2.

Tetramer⁺ (Tet⁺) cells were readily detected in the cTfh population and were highly enriched in the memory compared to the naive CD4⁺ T cell population, as expected (Fig. 2A). The frequency of Tet⁺ cTfh in CD4⁺ T cells was 4.4 times higher in the HIC than in the ART group (medians, 0.0049% for HIC versus 0.0011% for ART; *P* = 0.002) (Fig. 2B), pointing to the preservation of Gag293-specific cTfh in HIV controllers. Of note, Gag293-specific Tet⁺ cells could not be detected in the blood of patients with persistent HIV replication (not shown). Analysis of the absolute count of specific cTfh in the circulation supported the notion of a preserved antiviral response in HIV controllers, with a median of 42 versus 4.9 cTfh/ml blood in the HIC and ART groups, respectively (*P* = 0.0005; data not shown). To determine whether this difference was due to an enrichment of Gag293-specific cells in the cTfh subset, we compared the proportions of cTfh in the Tet⁺ and Tet[−] CD45RA[−] CD4⁺ T cell populations (Fig. 2C). This analysis did not reveal significant differences, with a proportion of cTfh that ranged in median between 23% and 29% of memory CD45RA[−] CD4⁺ T cells, in the Tet⁺ and Tet[−] populations of the two groups. Rather, the frequency of Tet⁺ cells in the total CD4⁺ T cell population distinguished the HIC and ART groups, with a 3.8-fold increase of specific cells in HIV controllers (medians, 0.019% for HIC versus 0.0049% for ART; *P* = 0.002) (Fig. 2D). Thus, the increased frequency of HIV-specific cTfh in controllers reflected an overall higher frequency of HIV-specific cells, rather than a preferential enrichment of specific cells in the cTfh subset.

Signs of antigenic activation in the HIV-specific cTfh population. The CCR7 marker remained highly expressed in HIV-specific cTfh, indicating a predominant central memory phenotype (Fig. 2A and E). However, a trend for decreased CCR7 expression was observed in the specific cTfh populations, reflecting a partial shift to an effector memory phenotype. CCR7 expression remained significantly higher in the Tet⁺ cTfh than in the Tet[−] MemX5[−] population in the HIC group (*P* = 0.023), but this difference was lost in the ART group, with a high intragroup variability in both groups. The trend for CCR7 decrease raised the possibility that HIV-specific cTfh underwent a degree of chronic antigenic stimulation. This notion was further supported by analyses of the naive (Nv), central memory (CM), effector memory (EM), and effector (Eff) subsets defined by the combination of the CCR7 and CD45RA markers (gating shown in Fig. S1 and S2). Namely, HIV-specific CXCR5⁺ (X5⁺) cells showed a shift in subset hierarchy, with a significant increase in the EM subset (*P* < 0.05) compared to nonspecific X5⁺ cells, where CM cells predominated (Fig. S3). However, subset distribution did not show significant differences between patient groups. Of note, the Eff subset (CD45RA⁺ CCR7[−]) proved significantly decreased (*P* < 0.01) in the specific compared to the nonspecific X5⁺ population, pointing to a lack of advanced effector differentiation in HIV-specific cells.

The CCR6 marker was also analyzed, as expression of this chemoreceptor has been associated with efficient cTfh function (13). The CXCR3 marker, which is often used to define less efficient Th1-like cTfh, could not be analyzed in this study, as it was partially internalized under the tetramer labeling conditions. CCR6 was found to be expressed at comparable levels in the MemX5[−] subsets of HIC and ART patients, in both the

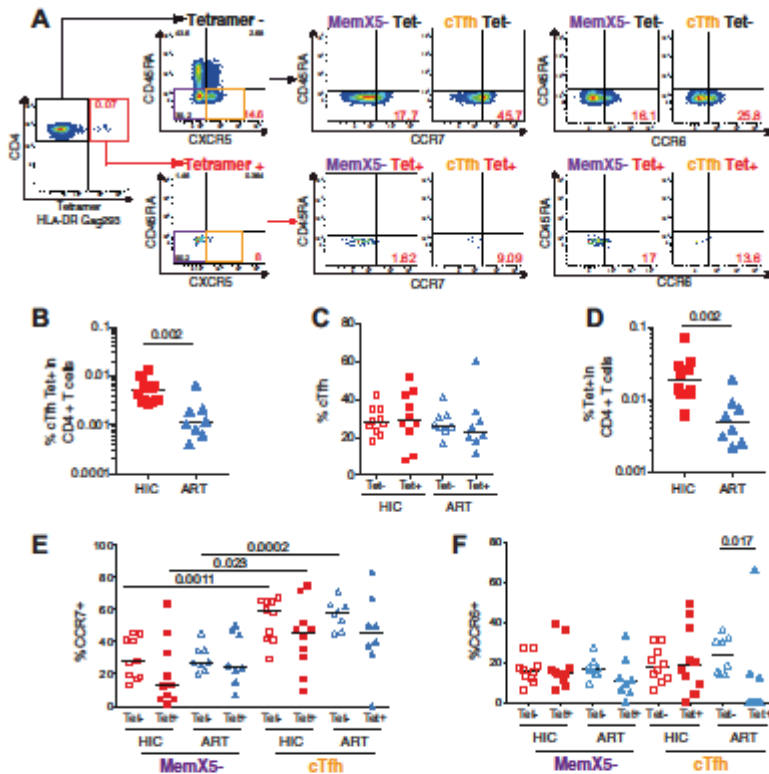


FIG 2 Phenotyping of HIV-specific cTfh cells. Phenotyping of CD4⁺ T cells derived from HIV controllers (HIC, *n* = 10) and treated patients (ART, *n* = 8) with Gag293-loaded MHC-II tetramers. (A) Gating strategy used to analyze HIV-specific CD4⁺ T cells, shown for one HIV controller. (Farthest left) Dot plot depicting the detection of Gag293-specific CD4⁺ T cells by MHC-II tetramer labeling, among total CD4⁺ T cells. (Middle left) Gates used to select MemX5⁺ (CD45RA⁺ CXCR5⁺; purple) and cTfh (CD45RA⁺ CXCR5⁺; orange) in Gag293-specific (bottom) or nonspecific (top) CD4⁺ T cell populations. (Middle and right) MemX5⁺ and cTfh populations were then analyzed in relation to CD45RA versus CCR7 (middle panels) or CD45RA versus CCR6 (right panels). (B) Frequency of Gag293-specific cTfh cells in the HIC and ART groups. (C) Comparison of the frequency of cTfh cells in the memory CD45RA⁺ CD4⁺ T cell populations that are Gag293 specific (Tet⁺) and nonspecific (Tet⁻) in the HIC and ART groups. (D) Frequency of total Gag293-specific cells in CD4⁺ T cells of controllers and treated patients. (E) Frequency of CCR7⁺ cells in the cTfh and MemX5⁺ cell populations: comparison between Gag293-specific (Tet⁺) and nonspecific (Tet⁻) CD4⁺ T cells in the HIC and ART groups. (F) Frequency of CCR6⁺ cells in the cTfh and MemX5⁺ cell populations, analyzed as in panel E. Bars represent medians. Significant differences (*P* < 0.05) obtained with the Mann-Whitney U test are reported.

Gag293-specific and nonspecific cell populations (Fig. 2F). In contrast, CCR6 was found to be significantly decreased in the specific compared to the nonspecific cTfh subset in the ART group (*P* = 0.017). Specific cTfh from the ART group also showed a trend for lower CCR6 expression than did those of the HIC group (*P* = 0.066), pointing to a possible impairment of HIV-specific cTfh function in treated patients.

A marked increase in PD-1 expression was noted in HIV-specific CD4⁺ T cells from controllers and treated patients, this increase being highly significant (*P* < 0.005) in both the cTfh and the MemX5⁺ subsets (Fig. 3A and B). As PD-1 induction is thought to result from TCR signaling upon cognate antigen recognition, these findings suggested that specific CD4⁺ T cells were chronically stimulated by Gag antigens, in spite of the very low viremia characteristic of both the controller and the treated patient

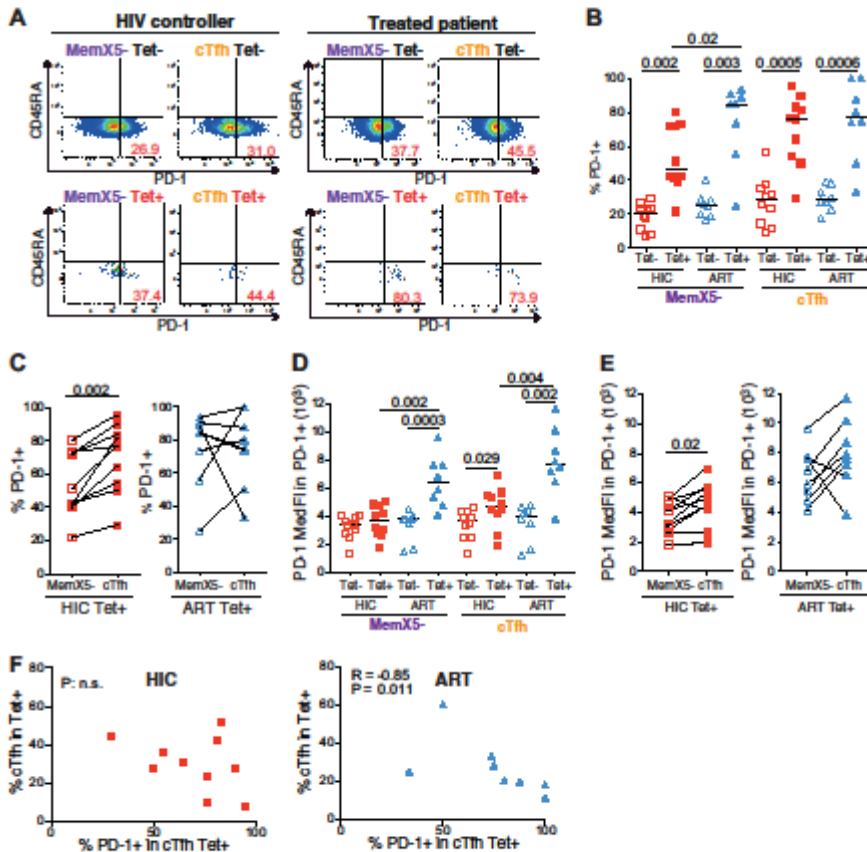


FIG 3 Analysis of PD-1 expression in HIV-specific cTfh cells. Phenotyping of Gag293-specific and nonspecific CD4⁺ T cells derived from HIV controllers (HIC, *n* = 10) and treated patients (ART, *n* = 8). The gating strategy used is identical to one described in the Fig. 2A legend. (A) Representative plots depicting the gating used for PD-1 analysis in CD4⁺ T cell populations. MemX5⁻ (left) and cTfh (right) populations were analyzed in relation to CD45RA versus PD-1 in Gag293-specific (bottom) and nonspecific (top) CD4⁺ T cell populations. Examples are shown for one HIV controller and one treated patient. (B) Frequency of PD-1⁺ cells in the cTfh and MemX5⁻ cell populations: comparison between the Gag293-specific (Tet⁺) and nonspecific (Tet⁻) CD4⁺ T cell populations in the HIC and ART groups. (C) Comparison of the frequency of PD-1⁺ cells in paired cTfh and MemX5⁻ Gag293-specific populations from the HIC and ART groups. (D) Median fluorescence intensity (MedFI) of PD-1 expression in the PD-1⁺ subset of cTfh and MemX5⁻ cell populations: comparison between Gag293-specific (Tet⁺) and nonspecific (Tet⁻) CD4⁺ T cell populations in the HIC and ART groups. (E) Comparison of the MedFI of PD-1⁺ cells in paired cTfh and MemX5⁻ Gag293-specific populations from the HIC and ART groups. (F) Correlation between the frequency of PD-1⁺ cells in the Gag293-specific cTfh population and the frequency of cTfh within the Gag293-specific population in the HIC (left) and ART (right) groups. Bars represent medians. Significant differences (*P* < 0.05) obtained by the Mann-Whitney U test (B and D), the Wilcoxon matched-pair statistical test (C and E), and Spearman's rank correlation coefficient test (F) are reported.

groups. Further analyses of HLA-DR expression, as measured by quantitative real-time PCR (qPCR), confirmed that all Gag293-specific cells, in both the cTfh and MemX5⁻ subsets, were significantly more activated than their nonspecific counterparts, supporting the notion of chronic antigenic stimulation (Fig. S4A). An additional activation marker, FAS (FAS cell surface death receptor), also showed a trend for higher expression in Gag293-specific cells, except, interestingly, in the specific cTfh population of HIV controllers (Fig. S4B).

HIV-specific cTfh expressed PD-1 at comparably high frequencies in the two groups (medians, 76.2% [HIC] versus 77.5% [ART] PD-1⁺ in Tet⁺ cTfh) (Fig. 3B), though

individual variability in PD-1 induction remained high. In contrast, PD-1 induction was significantly higher in the specific MemX5⁺ subset of treated patients than in that of controllers (85.0% [ART] versus 42.2% [HIC] PD-1⁺ in Tet⁺ MemX5⁺; $P = 0.02$), reflecting a higher level of chronic immune activation and possibly exhaustion in the specific CD4⁺ T cell population of treated patients. These findings were confirmed in analyses that distinguished the memory subsets within the specific X5⁺ and X5⁺ populations (Fig. S5), with equivalent frequencies of PD-1 expression in the X5⁺ subsets of the two groups but a significantly higher PD-1 expression in the CM and EM X5⁺ subsets in the ART group. Paired analysis of the specific cTfh and MemX5⁺ subsets in each patient showed that the frequency of PD-1 expression was in all cases higher in the specific cTfh subset for controllers ($P = 0.002$) (Fig. 3C). This was not the case for treated patients, as specific MemX5⁺ cells in this group could express PD-1 at very high levels (>80%). Paired analyses of PD-1 expression in memory subsets within the specific X5⁺ and X5⁺ populations gave similar results (Fig. S5C and D) (significant differences between X5⁺ and X5⁺ Nv, CM, and EM subsets in the HIC but not in the ART group), reinforcing the notion that abnormal immune activation persisted in treated patients even after long-term antiretroviral therapy. This notion was further supported by an analysis of CD8⁺ T cells, which showed a higher frequency of PD-1 expression in treated patients than in HIV controllers (median PD-1⁺, 18.65% in ART versus 13.45% in HIC; $P = 0.03$; data not shown).

To further evaluate the extent of PD-1 induction, we monitored the median fluorescent intensity (MedFI) of PD-1 labeling in the subpopulations of PD-1-positive cells (Fig. 3D). This analysis showed that the intensity of PD-1 expression per cell was higher in specific cells from treated patients than in those of controllers, both in the MemX5⁺ ($P = 0.002$) and in the cTfh ($P = 0.004$) subsets. Paired analysis confirmed that specific cTfh expressed PD-1 at higher levels than specific MemX5⁺ cells in controllers, while the difference was blurred in treated patients, for whom both specific cTfh and non-cTfh expressed PD-1 at very high levels (Fig. 3E). Thus, PD-1 expression was induced in all Gag293-specific CD4⁺ T cells in both controllers and treated patients, indicating that these cells were not quiescent but rather engaged in an active antiviral immune response. In HIV controllers, PD-1 induction was more marked in the specific cTfh subset, which may reflect the activation of T follicular helper function. In treated patients, PD-1 induction was more generalized and reached higher levels, pointing to the persistence of abnormal immune activation.

Of note, in the ART group, the percentage of PD-1 induction in the specific cTfh population correlated inversely with the frequency of cTfh in the Tet⁺ population ($R = -0.85$, $P = 0.011$) (Fig. 3F). This correlation was not observed in the HIC group, as some controllers could have a significant PD-1 induction without a decrease in the proportion of specific cTfh. The inverse correlation observed for treated patients could reflect either a loss or a relocalization of specific cTfh upon increasing immune activation, raising the possibility of cTfh immune exhaustion. To further address this issue, we measured the expression of two immune exhaustion markers, CTLA-4 and LAG-3, by single-cell qPCR. These analyses showed generally low expression of both markers in cTfh and did not reveal significant differences between the HIC and ART groups (Fig. S4C and D). A trend for higher CTLA-4 and LAG-3 expression in specific than in nonspecific CD4⁺ T cell populations was noted, though it did not reach significance. Taken together, the analysis of PD-1, HLA-DR, and FAS expression was consistent with signs of chronic activation in HIV-specific cTfh, which were more marked in treated patients than in HIV controllers. However, the generally low expression of the CTLA-4 and LAG-3 markers, and their comparable expression in the two patient groups, suggested that HIV-specific cTfh were not in a state of advanced immune exhaustion.

Low antibody neutralization titers in HIV controllers. To evaluate the humoral response in controlled HIV infection, we first measured the concentration of HIV-specific antibodies in patient plasma by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using values normalized to total plasma IgG content (Fig. S6). Env-specific antibodies

recognizing HIV-1 gp41, gp140, and gp160 were detected at comparable median values in the two groups, though individual variability was marked. Gag-specific antibodies directed at the p24 capsid protein showed a trend for higher concentrations in the HIC group, which did not reach significance ($P = 0.2$). Thus, the concentration of HIV-specific antibodies did not clearly distinguish the two patient groups.

We then analyzed the titers of neutralizing antibodies (NAbs) directed at HIV-1 in patient plasma (Table S2A). To this goal, serial dilutions of patient plasma were tested for their capacity to neutralize two tier 1 viral strains (63), six transmitted/founder (T/F) tier 2 strains, and one tier 3 T/F strain, as well as a negative-control murine leukemia virus (MLV) strain in a TZM-bl-based assay. Of note, plasma samples from treated patients neutralized the MLV control virus due to the presence of antiretroviral drugs and were not evaluated further. HIV controller plasma could in most cases neutralize the tier 1 HIV-1 strains tested but failed to neutralize the tier 2 and tier 3 T/F strains. Only one controller patient (HIC06) showed moderate neutralization titers (<100) against three of the tier 2 T/F strains tested. These moderate NAb levels appeared to be maintained over time, as testing of an HIC06 plasma sample obtained 8 months previously showed a similar neutralization pattern (Table S2B). Taken together, these data showed that NAb titers were low in HIV controllers, consistent with the literature (38, 64).

The cTfh CD4⁺ T cell subset provides efficient help to memory B cells *in vitro*.

As the antibody data did not preclude the possibility of a memory B cell response that could be reactivated upon stimulation, we developed an assay suited to the analysis of memory B cell-cTfh interactions. The assay relied on the coculture between sorted CD4⁺ T cell subsets and autologous memory B lymphocytes (BL). Sorted populations were $>98\%$ pure (see Fig. S7 for gating strategy). Sorted CD4⁺ T cell subsets included naive cells (CD45RA⁺ CCR7⁺), MemXS⁺ (CD45RA⁺ CXCR5⁺), and cTfh (CD45RA⁺ CXCR5⁺). Each sorted subset was cocultivated with autologous memory BL (CD3⁺ CD20⁺ CD27⁺) in the presence of superantigens, which induce polyclonal CD4⁺ T cell activation. CD4 helper function was analyzed by the induction of plasmablast differentiation, as measured by the number of CD38hi B cells in the coculture and by the amount of total immunoglobulin G (IgG) measured in coculture supernatants.

Functional analysis of healthy donor cells showed a clear hierarchy in the capacity of CD4⁺ T cell subsets to provide helper function to B cells, with cTfh proving more efficient than MemXS⁺ ($P = 0.03$), which were themselves more efficient than naive cells ($P = 0.03$) at inducing plasmablast differentiation (Fig. 4A and B). A similar hierarchy was observed in the production of IgG measured in day 12 supernatants: cTfh induced IgG secretion to a median concentration of $3 \mu\text{g/ml}$ and MemXS⁺ induced IgG to $0.5 \mu\text{g/ml}$, while naive CD4⁺ T cells failed to induce IgG secretion from autologous BL (Fig. 4C). The differentiation of plasmablasts in the cocultures tightly correlated with the induction of IgG secretion ($R = 0.89$, $P = 0.012$) (Fig. 4D), indicating that both parameters could be used to monitor cTfh function. Taken together, the data obtained with healthy donor cells confirmed that cTfh could provide bona fide help to BL after *in vitro* stimulation, confirming that cTfh provide a relevant model to study Tfh function (13).

Patient cTfh show a degree of functional impairment that can be reversed by IL-6 supplementation. The cTfh function showed signs of being perturbed in both the HIC and ART groups, as the hierarchy in helping capacity of the different CD4⁺ T cell subsets was not always conserved, with cTfh proving less efficient than MemXS⁺ cells at inducing IgG secretion for a few patients (Fig. 5A). As a consequence, IgG induction by the cTfh and MemXS⁺ subsets did not differ significantly, in the HIC as well as in the ART group. In addition, total IgG secreted in cTfh/BL cocultures showed a trend for decrease in the HIC and ART groups compared to the HD group, though the difference did not reach significance (Fig. 5B). Analysis of CD38hi plasmablasts in the cocultures led to similar conclusions, with in particular a trend for less efficient plasmablast differentiation in the ART group (Fig. 5C and D). Plasmablast induction still correlated with IgG secretion in patient cocultures, though the correlation was less tight than in

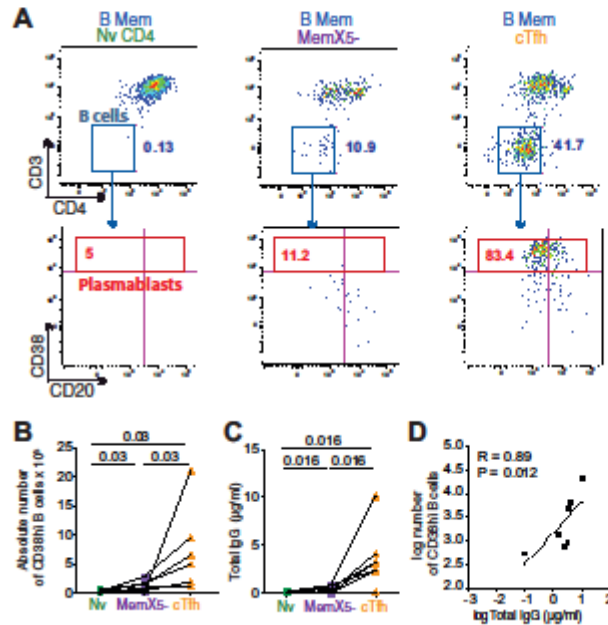


FIG 4. cTfh induction of B cell maturation and IgG production. Thawed PBMC from healthy donors were sorted into 3 CD4⁺ T cell subsets: cTfh (CD3⁺ CD20⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CXCR5⁺; orange), MemX5⁺ (CD3⁺ CD20⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CXCR5⁺; purple), and Nv or naive CD4⁺ T cells (CD3⁺ CD20⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺; green). The gating strategy is provided in Fig. S7. Each of these 3 subsets was then cocultured with autologous memory B cells (CD3⁺ CD20⁺ CD27⁺; blue) in the presence of superantigens. Cells and supernatants were harvested at days 7 and 12, respectively. (A) Representative flow cytometry plots depicting B cell maturation following 7 days of coculture. (Top panels) B cell gate (CD3⁺ CD4⁺); (bottom panels) analysis of plasmablasts (CD38hi) in the B cell population. (B) Absolute number of CD38hi B cells at day 7 of coculture with the 3 different CD4⁺ T cell subsets Nv (green), MemX5⁺ (purple), and cTfh (orange). (C) Total IgG secretion measured by ELISA in the supernatants of the cocultures at day 12. (D) Correlation between the number of CD38hi plasmablasts and total IgG production in the cocultures. Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Wilcoxon matched-pairs statistical test and Spearman's rank correlation coefficient test are reported.

healthy donor cocultures ($R = 0.65$, $P = 0.01$) (Fig. 5E), supporting the notion of perturbed cTfh-BL interactions in both patient groups.

As production of the IL-6 cytokine by plasmablasts was recently shown to support Tfh function (65), we set out to test the effect of IL-6 addition to the cTfh/BL cocultures. Interestingly, IL-6 supplementation restored cTfh function in the coculture of patient cells, as indicated by a significant increase in IgG production in both the HIC and ART groups ($P = 0.0078$ in both cases) (Fig. 5F). IL-6 restored IgG production to levels higher than those seen in cocultures from healthy donors (medians: HIC plus IL-6, 3.6 µg/ml; ART plus IL-6, 16.8 µg/ml; HD, 2.41 µg/ml). These findings suggested that the perturbation in patient cTfh function was not intrinsic but rather resulted from limiting or dysregulated cytokine secretion.

High-level specific IgG production capacity in HIV controllers. To evaluate the extent to which cTfh could stimulate HIV-specific memory B cell responses, we measured the production of IgG specific for HIV-1 p24 Gag or gp140 Env in cTfh/BL coculture supernatants. Recombinant proteins derived from HIV-1 subtype B, p24 Gag IIIB and the trimeric Env gp140 MN-LAI (66), were used as capture antigens as this subtype was the most prevalent among studied patients.

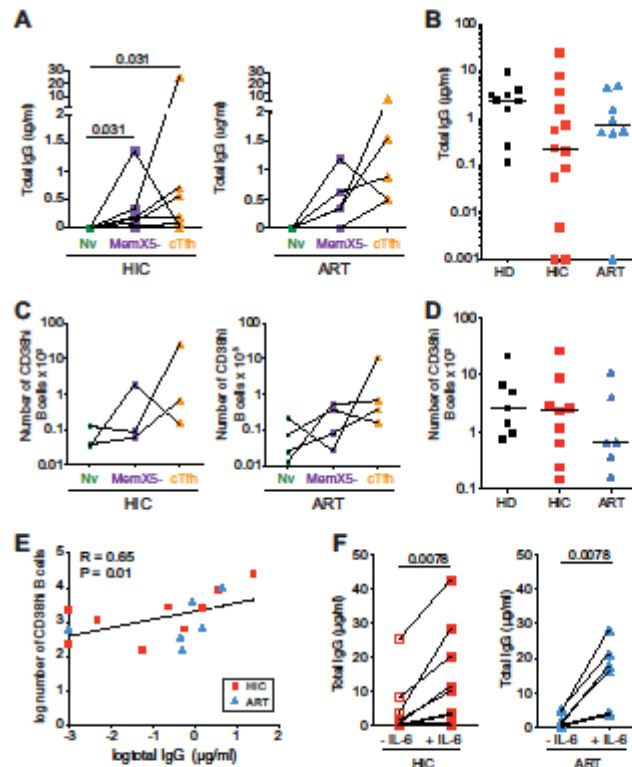


FIG 5 Analysis of patient cTfh-mediated help to autologous memory B cells. PBMC from healthy donors (HD), HIV controllers (HIC), and treated patients (ART) were sorted into 3 CD4⁺ T cell subsets and cocultured with memory B cells as described in the Fig. 4 legend. (A) Total IgG secretion was measured by ELISA in coculture supernatants at day 12. IgG secretion was compared in cocultures of memory B cells with naive CD4⁺ T cells (Nv), memory CXCR5⁺ CD4⁺ T cells (MemXS⁺), and cTfh in the HIC ($n = 6$, left) and ART ($n = 5$, right) groups. (B) Comparison of total IgG secretion in memory B cells/cTfh cocultures for the HD ($n = 9$), HIC ($n = 13$), and ART ($n = 8$) groups. (C) The B cell phenotype was analyzed at day 7 of coculture. The absolute numbers of plasmablasts (CD3⁺ CD4⁺ CD38^{hi}) present in the different coculture systems (Nv, MemXS⁺, and cTfh) were compared in HIC ($n = 3$, left) and ART ($n = 4$, right) patients. (D) Comparison of the absolute number of plasmablasts in memory B cells/cTfh cocultures in the HD ($n = 7$), HIC ($n = 9$), and ART ($n = 6$) groups. (E) Correlation between the amount of secreted IgG and the absolute number of plasmablasts in memory B cells/cTfh cocultures from HIC (red squares) and ART (blue triangles) patients. (F) Effects of IL-6 addition on total IgG secretion in memory B cells/cTfh cocultures from HIC (left panel) and ART (right panel) patients. Bars represent medians. Significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Wilcoxon matched-pair statistical test (A, C, and F), the Mann-Whitney U test (B and D), and Spearman's rank correlation coefficient test (E) are reported.

The cTfh/BL cocultures of controller patients showed a trend for higher production of anti-Gag IgG compared to those of treated patients, with a median 7-fold difference between the two groups (Fig. 6A, left). Supplementation with IL-6 significantly increased Gag-specific IgG production in both groups but dampened differences between the HIC and the ART groups (Fig. 6A, right). To take into account variations in total IgG production, we then computed the ratio of Gag-specific to total IgG (Fig. 6B). In this normalized analysis, Gag-specific IgG production was 3.5-fold higher in the HIC group in the absence of IL-6 and 4.8-fold higher in the HIC group in the presence of IL-6, with the difference reaching significance in the latter case ($P = 0.0499$). Interestingly,

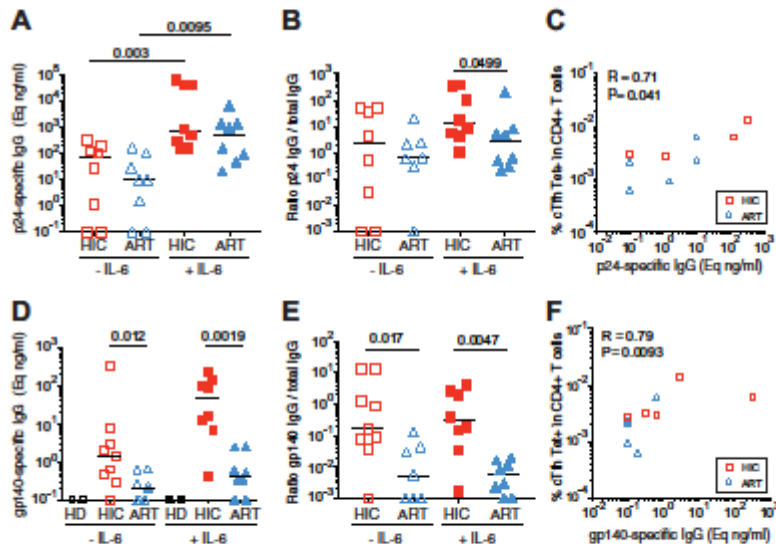


FIG 6 Analysis of HIV-specific IgG production stimulated by cTfh help. cTfh cells (CD3⁺ CD20⁺ CD45RA⁺ CXCR5⁺) and memory B cells (CD3⁺ CD20⁺ CD27⁺) were sorted from patient PBMC samples and cocultured with superantigens in the presence or absence of IL-6. Supernatants were harvested at day 12. (A) Levels of Gag p24-specific IgG production in the presence or absence of IL-6, as measured by ELISA in cocultures from HIC (n = 8) and ART (n = 8) patient cocultures. (B) Ratio of p24-specific IgG to total IgG production in the presence or absence of IL-6 in HIC (n = 8) and ART (n = 8) patient cocultures. (C) Correlation between the level of p24-specific IgG production and the frequency of Gag293-specific cTfh in CD4⁺ T cells in HIC (red squares) and ART (blue triangles) patients. (D) Level of Env gp140-specific IgG production in the presence or absence of IL-6, as measured by ELISA in cocultures from HIC (n = 9) and ART (n = 8) patients. (E) Ratio of gp140-specific IgG to total IgG production in the presence or absence of IL-6 in HIC (n = 8) and ART (n = 8) patient cocultures. (F) Correlation between the level of gp140-specific IgG production and the frequency of Gag293-specific cTfh in CD4⁺ T cells in HIC (red squares) and ART (blue triangles) patients. Significant differences (P < 0.05) obtained by the Mann-Whitney U test (A, B, D, and E) and Spearman's rank correlation coefficient test (C and F) are reported.

the frequency of Gag293-specific cTfh in the circulation correlated with Gag-specific IgG production in the cocultures ($R = 0.71$, $P = 0.041$) (Fig. 6C), supporting the notion that Tfh function contributed to the persistence of HIV-specific memory B cell responses.

Analysis of Env gp140-specific IgG production in the cTfh/BL cocultures revealed more pronounced differences between the HIC and the ART groups. Env-specific IgG was produced in median at 6.4-fold-higher levels in the HIC than in the ART group ($P = 0.012$) (Fig. 6D). IL-6 supplementation did not abrogate but rather amplified the difference, with 113-fold-higher levels of Env-specific IgG in the HIC group ($P = 0.0019$). After normalizing for total IgG production, the differences in Env-specific IgG production between the HIC and the ART groups were 32-fold in the absence of IL-6 ($P = 0.017$) (Fig. 6E) and were increased to 51-fold in the presence of IL-6 ($P = 0.0047$). It was striking that IL-6 supplementation had little effect on the synthesis of Env-specific IgG in the ART group, while total and Gag-specific IgG production responded to IL-6 supplementation for the same patients. This observation was confirmed by an analysis of the ratios of IgG produced in the presence and absence of IL-6, which were significantly lower for Env-specific IgG than for total or Gag-specific IgG in the ART group (Fig. S8). Of note, the frequency of Gag293-specific cTfh in the circulation showed a strong correlation with Env-specific IgG production in the cocultures ($R = 0.79$, $P = 0.0093$) (Fig. 6F), raising the possibility of intrastructural help provided by Gag-specific Tfh to Env-specific memory B cells (see Discussion). Taken together, these findings showed that treated patients, who had low frequencies of HIV-specific cTfh in the

circulation, maintained defective memory B cell responses in spite of long-term therapy, with the defect being more marked for Env-specific than Gag-specific memory B cells. In contrast, key cTfh-B cell interactions were preserved in controlled HIV infection, resulting in potent memory B cell responses to both Gag and Env antigens.

DISCUSSION

This study provides evidence for the persistence of a highly functional HIV-specific cTfh population in controlled HIV infection. The use of MHC-II tetramer labeling enabled, for the first time to our knowledge, a direct quantitation and phenotypic characterization of HIV-specific cTfh in the circulation. This approach revealed significantly higher frequency and numbers of Gag-specific cTfh in HIV controllers than in treated patients, even though both groups were characterized by long-term viral suppression and very low antigenic loads. These findings are in line with the notion of a potent CD4-mediated adaptive response in controlled HIV infection and highlight in contrast the incomplete reconstitution of antiviral immunity in patients undergoing long-term antiretroviral therapy (47, 67). The high frequency of specific cTfh in the controller group suggests that successful HIV containment does not rely uniquely on Th1 responses, which are typically induced in the setting of chronic viral infections, but also involves Tfh help provided to the humoral arm of the immune response. This notion is supported by the potent induction of HIV-specific IgG detected in cTfh/B cell cocultures from controllers, as well as by the high frequency of memory B cells recently reported in the setting of controlled HIV infection (40, 55–57).

Unexpectedly, HIV-specific cTfh from both groups of patients showed signs of ongoing activation, as indicated by a marked increase in PD-1 and HLA-DR expression, and a moderate decrease of CCR7 expression compared to the total cTfh population. PD-1 induction is thought to reflect previous TCR engagement (68, 69), suggesting that cTfh encounter their cognate antigen, in this case Gag, even in situations of controlled viremia. Epigenetic studies indicate that PD-1 can in certain cases acquire constitutive expression in T cells after prolonged exposure to HIV (70), and we thus cannot rule out the possibility that high PD-1 expression in specific cTfh reflects a previous phase of viral replication, especially in the case of patients who had experienced high viral loads prior to treatment. However, the fact that PD-1 induction is also seen in cTfh of controllers, who did not experience massive HIV replication except possibly in acute infection, and the observation of a trend for CCR7 downregulation support the possibility of ongoing antigenic stimulation and partial shift toward an effector memory phenotype. This notion is further supported by the marked induction of HLA-DR expression, which points to a persistent activation of the HIV-specific cTfh population. Of note, expression of the CTLA-4 and LAG-3 markers remained low in HIV-specific cTfh, indicating that these cells were activated but not in an advanced stage of immune exhaustion. Given that tissue Tfh have been recently identified as the major HIV/SIV reservoir in lymphoid organs, in treated patients (25, 26, 35) but also in a simian model of controlled SIV infection (34), a likely possibility is that cTfh encountered their cognate antigen while recirculating through these organs. Systemically, HIV controllers show moderate but detectable signs of immune activation that subside upon initiation of antiretroviral therapy (71), suggesting that residual viral replication in lymphoid tissues drives immune activation, while the virus remains efficiently contained in the periphery. Another reason for the activation of specific cTfh in controllers could lie in their expression of particularly sensitive TCRs, as we recently reported that controller CD4⁺ T cells expressed TCRs of significantly higher affinity for Gag293–MHC-II complexes than those found in treated patients (53, 61). Thus, even minimal levels of viral antigens may trigger potent TCR signals in controller cTfh, which would promote their B cell helper function.

Of note, controller specific CD4⁺ T cells showed stronger PD-1 expression in the cTfh compartment than in the MemXS[−] memory compartment, suggesting that cTfh may be more frequently exposed to viral antigen than specific cells that do not traffic through GC. In contrast, treated patients showed high PD-1 expression (≈75% PD-1⁺)

in both cTfh and MemX⁺ specific cells, which may point to the persistence of viral antigens in both GC and extrafollicular sites. It was also noteworthy that the intensity of PD-1 expression was significantly higher in the specific CD4⁺ T cell subsets of treated patients than of controllers, with the highest level of PD-1 expression per cell seen in the specific cTfh subset of treated patients. Given the negative regulatory function of the PD-1 receptor (68), these very high expression levels may impair cTfh function in treated patients. This notion is compatible with the report of a functional defect of Tfh function in HIV-infected individuals, due to overexpression of the PDL-1 ligand in lymph node B cells (39). In this study, the PD-1/PD-L1 interaction was shown to limit Tfh proliferation and helper function, which may help explain the persistent defect of memory B cell responses in treated patients. The decreased CCR6 expression that we observed in HIV-specific cTfh from treated patients also points to cTfh dysfunction, as low CCR6 expression may reflect perturbed differentiation (13) and may directly impair cTfh relocalization to infected tissues. The higher FAS receptor expression in specific cTfh from treated patients may also contribute to immune dysfunction, by priming cTfh-interacting cells for apoptosis. Taken together, the phenotypic analysis of HIV-specific cTfh highlighted signs of generalized immune activation in treated patients and of a more contained but nevertheless detectable activation in HIV controllers. The finding that HIV-specific cTfh are not quiescent in the latter group suggests that spontaneous HIV control relies on chronic stimulation of T follicular helper function, which may be needed to sustain high-level memory B cell responses.

Several studies have reported associations between the frequency of particular cTfh subsets and the breadth of circulating NABs directed at HIV (23, 24, 72). These findings point to the need for a generally preserved cTfh population for the development of NAB breadth, which relies on continuous cycles of B cell maturation. A limitation of our study is that we did not include a control group of patients who acquired NAB breadth and who are thought to harbor a highly functional cTfh population. However, it is now apparent from several studies, including ours, that HIV controllers can develop potent memory B cell responses without high NAB titers (40, 55, 56) and that assessing the "silent" memory B cell compartment is needed to evaluate the status of the antiviral humoral response. The frequency of HIV-specific memory B cells still correlates with bNAB titers in a subset of HIV controllers who express the HLA-B57 allele (57), suggesting that in this particular group HIV-specific B cells have not returned to a quiescent memory state. Another study reported that the frequency of HIV-specific memory B cells decreased in HIV controllers who were given antiretroviral therapy, indicating that residual viral replication could still be a driver of memory B cell responses in the controller group (56). Our results suggest that another key determinant of the magnitude of memory B cell responses is the availability of T follicular help, as indicated by the positive correlation between HIV-specific cTfh frequency and HIV-specific IgG secretion by stimulated memory B cells. These findings are in line with a recent report where Tfh function defined functionally by IL-21 secretion in response to HIV peptides showed an association with Env-specific memory B cells (73). Genetic analyses of Env-specific IgG derived from controller memory B cells have been reported in a few cases and have revealed an unexpectedly high level of somatic hypermutation, reinforcing the notion of a continuous involvement of T follicular help in maintaining the controller humoral response (74).

Intriguingly, measurement of total IgG production suggested a perturbation of cTfh-B cell interactions in both groups of HIV-infected patients compared to healthy blood donors. The impairment was not generalized, but a subset of patients showed decreased IgG induction and plasmablast differentiation in cTfh/BL cocultures. The fact that these parameters could be restored by IL-6 supplementation suggested that cytokine imbalance could be involved. A possible explanation may lie in a shift in the Th1/Tfh balance, considering that these two CD4⁺ T cell populations depend on antagonist differentiation factors and that chronic viral infections are thought to lead to a pronounced Th1 bias (9). The demonstration that IL-2-dependent signaling inhibits cTfh function in HIV-infected patients is compatible with the notion that Th1-derived



in both cTfh and MemX⁺ specific cells, which may point to the persistence of viral antigens in both GC and extrafollicular sites. It was also noteworthy that the intensity of PD-1 expression was significantly higher in the specific CD4⁺ T cell subsets of treated patients than of controllers, with the highest level of PD-1 expression per cell seen in the specific cTfh subset of treated patients. Given the negative regulatory function of the PD-1 receptor (68), these very high expression levels may impair cTfh function in treated patients. This notion is compatible with the report of a functional defect of Tfh function in HIV-infected individuals, due to overexpression of the PDL-1 ligand in lymph node B cells (39). In this study, the PD-1/PD-L1 interaction was shown to limit Tfh proliferation and helper function, which may help explain the persistent defect of memory B cell responses in treated patients. The decreased CCR6 expression that we observed in HIV-specific cTfh from treated patients also points to cTfh dysfunction, as low CCR6 expression may reflect perturbed differentiation (13) and may directly impair cTfh relocalization to infected tissues. The higher FAS receptor expression in specific cTfh from treated patients may also contribute to immune dysfunction, by priming cTfh-interacting cells for apoptosis. Taken together, the phenotypic analysis of HIV-specific cTfh highlighted signs of generalized immune activation in treated patients and of a more contained but nevertheless detectable activation in HIV controllers. The finding that HIV-specific cTfh are not quiescent in the latter group suggests that spontaneous HIV control relies on chronic stimulation of T follicular helper function, which may be needed to sustain high-level memory B cell responses.

Several studies have reported associations between the frequency of particular cTfh subsets and the breadth of circulating NABs directed at HIV (23, 24, 72). These findings point to the need for a generally preserved cTfh population for the development of NAb breadth, which relies on continuous cycles of B cell maturation. A limitation of our study is that we did not include a control group of patients who acquired NAb breadth and who are thought to harbor a highly functional cTfh population. However, it is now apparent from several studies, including ours, that HIV controllers can develop potent memory B cell responses without high NAb titers (40, 55, 56) and that assessing the "silent" memory B cell compartment is needed to evaluate the status of the antiviral humoral response. The frequency of HIV-specific memory B cells still correlates with bNAb titers in a subset of HIV controllers who express the HLA-B57 allele (57), suggesting that in this particular group HIV-specific B cells have not returned to a quiescent memory state. Another study reported that the frequency of HIV-specific memory B cells decreased in HIV controllers who were given antiretroviral therapy, indicating that residual viral replication could still be a driver of memory B cell responses in the controller group (56). Our results suggest that another key determinant of the magnitude of memory B cell responses is the availability of T follicular help, as indicated by the positive correlation between HIV-specific cTfh frequency and HIV-specific IgG secretion by stimulated memory B cells. These findings are in line with a recent report where Tfh function defined functionally by IL-21 secretion in response to HIV peptides showed an association with Env-specific memory B cells (73). Genetic analyses of Env-specific IgG derived from controller memory B cells have been reported in a few cases and have revealed an unexpectedly high level of somatic hypermutation, reinforcing the notion of a continuous involvement of T follicular help in maintaining the controller humoral response (74).

Intriguingly, measurement of total IgG production suggested a perturbation of cTfh-B cell interactions in both groups of HIV-infected patients compared to healthy blood donors. The impairment was not generalized, but a subset of patients showed decreased IgG induction and plasmablast differentiation in cTfh/BL cocultures. The fact that these parameters could be restored by IL-6 supplementation suggested that cytokine imbalance could be involved. A possible explanation may lie in a shift in the Th1/Tfh balance, considering that these two CD4⁺ T cell populations depend on antagonist differentiation factors and that chronic viral infections are thought to lead to a pronounced Th1 bias (9). The demonstration that IL-2-dependent signaling inhibits cTfh function in HIV-infected patients is compatible with the notion that Th1-derived

count for the positive correlation that we observed between Gag-specific cTfh and the induction of Env-specific IgG.

In conclusion, controlled HIV infection was characterized by a high frequency of cTfh that showed signs of antigenic stimulation, pointing to an ongoing maturation of the humoral response. Functional assays revealed preserved cTfh-B cell interactions that sustained high-level HIV-specific memory B cell responses. These findings suggest that humoral immunity plays an underappreciated role in HIV control and that immunotherapeutic approaches that aim at a functional HIV cure should elicit potent Tfh function.

MATERIALS AND METHODS

Study design. HIV controllers (HC group; $n = 15$) were recruited through the CO21 CODEX cohort implemented by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les H patites Virales (ANRS). HIV controllers were defined as HIV-1-infected patients who had been seropositive for >5 years, who had received no antiretroviral treatment, and for whom >90% of plasma viral load measurements were undetectable by standard assays. All HIV controllers included in the study had current viral loads of <50 copies/ml. The group of efficiently treated patients (ART group; $n = 15$) had received antiretroviral therapy for a minimum of 5 years and showed long-term HIV-1 suppression with viral loads of <50 copies/ml. Treated patients were recruited at the Raymond Poincaré and Bicêtre hospitals (France). Patients were included in the tetramer study if their genotype matched at least one of the following alleles: DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0405, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1302, or DRB1*1502 (see Table S1 in the supplemental material). Healthy donors were anonymous volunteers who donated blood at the Etablissement Français du Sang. The study was promoted by ANRS and approved by the Comité de Protection des Personnes IDF-VII under number 11-33. All participants gave written informed consent prior to inclusion in the study.

Antibodies. The following antibodies were used for cell surface staining: CD3-eFluor 780-allophycocyanin (eF780-APC; clone UCHL1), TCR-allophycocyanin (APC; clone IP26), and IL-2-APC (clone MQ1-17H12) (all from eBioscience); CD4-BD Horizon R phycoerythrin-CF594 (PE-CF594; clone RPA-T4), CD27-PE-Cy7 (Pe-Cy7-clone M-T271), CXCR5-Alexa Fluor 488 (AF488; clone RF882), and CCR7-Alexa Fluor 647 (AF647; clone 3D12) (all from BD Biosciences); CD14-Viogreen (clone TUK4) and CD20-Viogreen (clone LT29) (from Miltenyi Biotec); and CD38-Alexa Fluor 700 (AF700; clone HIT2), CD20-peridinin chlorophyll protein (PerCP/Cy5.5 (clone 2H7), CD8-bright violet 785 (BV785; clone RPA-T8), CD45RA-bright violet 421 (BV421; clone HI100), CCR7-PE-Cy7 (clone G043H7), and CD3-APC (clone SK7) (all from BioLegend). The fixable viability dye eFluor 506 (eF506; eBioscience) was added to restrict the analysis to live cells.

Cell culture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood via density gradient centrifugation on Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences) and were either cryopreserved for future cell sorting or directly used for tetramer staining and cell surface phenotyping.

MHC-II tetramer labeling and cTfh phenotyping. Patients were genotyped for the HLA-DRB1 gene at a 4-digit resolution using the INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus kit (Fujirebio). APC-labeled MHC-II tetramers loaded with Gag293 peptide (FRDYVDFYKTLRAEQASQE) for the DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*0405, DRB1*0701, DRB1*1502, and DRB1*0101 alleles were obtained through the NIH Tetramer Core Facility at Emory University, Atlanta, GA. DRB1*1101 and DRB1*1302 biotinylated monomers were obtained through the Tetramer Core Laboratory of the Benaroya Research Institute (Seattle, WA). Monomers were loaded with 0.2 mg/ml peptide by incubation at 37 C for 72 h in the presence of 2.5 mg/ml *N*-octyl- -D-glucopyranoside and protease inhibitors. Peptide-loaded monomers were tetramerized using APC-conjugated streptavidin (eBioscience). For each tetramer loaded with the Gag293 peptide, a corresponding control tetramer was loaded with an irrelevant peptide (the CLIP peptide PVSKMRMATPLMQA).

For the *ex vivo* detection of Gag293-specific CD4⁺ T cells, patient PBMC were labeled with MHC-II tetramers as follows: 10⁶ PBMC were incubated with 1  g MHC-II tetramer/10⁶ cells at a concentration of  1  g/ml in complete RPMI medium supplemented with 15% human AB serum for 90 min at 4 C. Antibodies for surface markers were added for the last 30 min of labeling, using the following combination: CD3-eF780-APC, CD20-Viogreen, CD14-Viogreen, CD8-BV785, CD4-PE-CF594, CD45RA-BV421, CCR7-PE-Cy7, CXCR5-AF488, PD-1-PE, and Viability-eF506. Cells were washed twice with PBA (phosphate-buffered saline [PBS], 1% bovine serum albumin [BSA], 0.09% azide) and fixed using 2% paraformaldehyde (PFA) in PBS. Fluorescence was collected on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). All flow cytometry experiments were analyzed with FlowJo v8.8 software (Tree Star Inc.). Analysis was performed on singlet viable single cells, gated according to morphological criteria and viability dye expression.

For cTfh phenotyping, 1   10⁶ cells were stained in a total volume of 100  l PBA with the same antibody panel as described above for 30 min at 4 C. Cells were washed twice with PBA, fixed in 2% PFA, and analyzed on an LSR Fortessa flow cytometer as described above.

Antibody neutralization assay. For neutralization, pseudoviruses were produced by cotransfecting 293-T cells with an HIV-1 Env expression plasmid (SF162.LS or MW965.26) and an Env-deficient HIV-1 backbone plasmid (pSG  Env). Infectious molecular clones of transmitted/founder viruses CH058, CH077, CH106, RH  A, THRO4156.18, REJO 4541.67, and TRUO4551.58 were obtained through the NIH AIDS Reagent Program. The corresponding viruses were produced by direct transfection of 293-T cells as previously described (57).

Plasma samples were tested for their ability to neutralize HIV-1 using the TZM-bl neutralization assay as described previously (85). Negative controls consisted of HIV-negative plasma from healthy blood donors. The presence of nonspecific neutralizing activity in patient plasma was tested by their capacity to neutralize the murine retrovirus MLV. Two tier 1 reference strains (SF162.LS, subtype B, and MW965.26, subtype C), six tier 2 transmitted/founder subtype B HIV-1 strains (CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18, and REJO4541.67), and one tier 3 transmitted/founder subtype B HIV-1 strain (TRJO4551.58) were tested. The 50% inhibitory reciprocal dilution (IRD₅₀) was defined as the reciprocal of the sample dilution that caused a 50% reduction in relative luminescence units (RLU).

Fluorescence-activated cell sorting (FACS). Following an overnight culture at a concentration of 5×10^4 cells/ml, PBMC were washed with PBS-1% fetal bovine serum (FBS). Cells were then stained for 30 min at 4°C at 40×10^4 cells/ml. The cell surface antibody panel consisted of the following antibodies: CD3-eF780-APC, CD20-VioGreen, CD8-BV785, CD4-PE-CF594, CD45RA-BV421, CCR7-AF647, CXCR5-AF488, and CD27-PE-Cy7. Stained samples were sorted using a FACSaria II cell sorter (BD Biosciences) installed in a microbiological safety cabinet. The collected cells were directly used for coculture assays.

cTfh/B1 coculture assays. The cTfh cell population defined as CD3⁺ CD20⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CXCR5⁺, MemX5⁺ cells defined as CD3⁺ CD20⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CXCR5⁺, or naive CD4⁺ T cells (CD3⁺ CD20⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺) were sorted and plated in a 96-well plate in the presence of memory B cells (CD3⁺ CD20⁺ CD27⁺) at a 1:1 ratio (20×10^4 cells each) in the presence of 1 µg/ml staphylococcal enterotoxin A (SEA) and 1 µg/ml staphylococcal enterotoxin E (SEE) in complete RPMI 1640 medium, in the presence or absence of IL-6 at 10 ng/ml (Mitenyi Biotec). B cells were analyzed for their phenotype at day 7 of coculture using the following antibody combination: CD3-APC, CD4-PE-CF594, CD20-PerCP-Cy5.5, CD38-AF700, CD27-PE-Cy7, and Viability-eF506. Fluorescence was collected on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). ELISAs were performed on supernatants collected at day 12 of coculture for the detection of total, p24-specific, and gp140-specific immunoglobulins.

ELISAs. Analysis of total IgG production in coculture supernatants was performed using the human IgG kit (GenWay, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. To detect Env-specific IgG production, we used as antigen the trimeric glycoprotein gp140 MN-LAI, which consists of the gp120 subunit from HIV-1 clone MN fused to the extracellular domain of HIV-1 LAI gp41 (66). Ninety-six-well Immulon 2B plates (Thermo Scientific) were coated overnight at 4°C with 2.5 µg/ml of gp140 MN-LAI in PBS. The following day, plates were washed four times with PBS plus 0.05% Tween 20 plus 10 mM EDTA (PBST) and blocked for 2 h with PBST plus 5% FBS at room temperature (RT). Plates were subsequently washed, and the culture supernatants were added at decreasing dilutions for 2 h at RT. The plates were then washed and incubated with secondary anti-human IgG-horse radish peroxidase (HRP) at a concentration of 0.4 µg/ml (Jackson ImmunoResearch) for 1 h at RT. Plates were then thoroughly washed, and 100 µl of tetramethylbenzidine substrate (TMB; Sigma-Aldrich) was added until the appearance of color. The enzymatic reaction was stopped by the addition of 100 µl of 0.5 M H₂SO₄, and the optical density (OD) was then measured at a 450-nm wavelength. Env-specific IgG production was evaluated in equivalent (Eq) micrograms per milliliter, after normalization to a standard curve obtained with the human monoclonal antibody (MAb) 2G12.

To detect Gag-specific IgG, a recombinant p24 Gag protein produced in baculovirus (reagent number 12028 from the NIH AIDS Reagent Program) was used as a capture antigen. The p24 Gag protein was coated at 2 µg/ml in bicarbonate buffer (pH 9.6) on MaxiSorp 96-well plates (Nunc) overnight at 4°C. The ELISA was then carried out as described above. Gag-specific IgG production was evaluated in equivalent (Eq) micrograms per milliliter, after normalization to a standard curve obtained with an HIV controller plasma.

HIV-specific IgGs were detected in patient plasma as previously described (57). Briefly, 96-well plates were coated overnight in carbonate buffer with the following proteins: 1 µg/ml of sheep anti-human IgG (Binding Site, France) for detecting total IgGs, 1 µg/ml of gp140 or gp160 MN-LAI (86) for detecting Env-specific IgGs, 1 µg/ml of gp41 S30 (87) for detecting anti-gp41 IgGs, and 0.5 µg/ml of Gag p24 protein (88) for detecting anti-p24 IgGs. After saturation with PBS containing 5% BSA, plates were incubated with diluted sera for 2 h at 37°C. IgGs were detected by addition of a secondary goat anti-human IgG conjugated to HRP, followed by incubation with the TMB substrate. Concentrations of IgGs were estimated according to an internal IgG standard.

Statistical analyses. Comparisons between groups (HD, HIC, and ART) were performed using a nonparametric two-tailed Mann-Whitney U test. For paired analyses, we used the nonparametric Wilcoxon matched-pair signed-rank test or the two-tailed paired *t* test. Correlations were analyzed with Spearman's rank correlation coefficient. All statistical analyses were made using the Prism v6.0 software (GraphPad). Differences of *P* < 0.05 were considered significant. Horizontal bars represent medians in all cases.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.00317-18>.

FIG S1, PDF file, 1.4 MB.

FIG S2, PDF file, 0.8 MB.

FIG S3, PDF file, 0.4 MB.

FIG S4, PDF file, 1.4 MB.

FIG S5, PDF file, 0.4 MB.

FIG S6, PDF file, 0.1 MB.
 FIG S7, PDF file, 0.5 MB.
 FIG S8, PDF file, 0.1 MB.
 TABLE S1, PDF file, 0.04 MB.
 TABLE S2, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out in the frame of the ANRS EP36 HIV Controllers Study Group. We are grateful to patients who participated to the study. We thank the clinicians who recruited patients for this study: Huguette Berth , Dominique Bomarel, Olivier Bouchaud, Patricia Honor , Philippe Genet, Juliette Gerbe, Olivier Patey, Laurent Richier, Katia Bourdic, Pierre-Marie Girard, B n dicte Lefebvre, Mich le Pauchard, Jean-Michel Molina, Sylvie Parlier, Caroline Lascaux-Combe, Samuel Ferret, Valérie Garrait, and Isabelle DeLacroix-Szmania. We thank Véronique Avettand-Fenoel for discussions. We acknowledge the Cytometry and Biomarkers UTECHS at the Pasteur Institute Center for Translational Science for support in conducting this study. MHC-II tetramer reagents were provided by the NIH Tetramer Core Facility at Emory University. The following reagent was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 IIIB p24 recombinant protein from ImmunoDX, LLC.

L.A.C. is supported by grants from ANRS (EP36-10) and Sidaction (AI25-1-02343); M.C. was the recipient of a Ministère de la Recherche doctoral fellowship, followed by a Sidaction fellowship; M.G. was the recipient of an Agence Nationale de la Recherche (ANR) postdoctoral fellowship.

REFERENCES

1. Schaefer P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. 2000. CXCR3 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 192:1553–1562. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1553>.
2. Breitfeld D, Ohi L, Krammer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Forster R. 2000. Follicular B helper T cells express CXCR3 chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192:1545–1552. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1545>.
3. Haverstick-Daughton C, Lee JH, Crotty S. 2017. Tfh cells and HIV bnAbs, an immunodominance model of the HIV neutralizing antibody generation problem. *Immunol Rev* 275:49–61. <https://doi.org/10.1111/imr.12512>.
4. Ma CS, Doernick EK, Batten M, Tangye SG. 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* 209:1241–1253. <https://doi.org/10.1084/jem.20120994>.
5. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. 2016. Follicular helper T cells. *Annu Rev Immunol* 34:335–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055605>.
6. Nuneva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jettan AM, Tian Q, Dong C. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29:138–149. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.009>.
7. Nuneva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, Dong C. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001–1005. <https://doi.org/10.1126/science.1176676>.
8. Baquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK. 2009. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10:167–175. <https://doi.org/10.1038/ni.1690>.
9. Crotty S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41:529–542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>.
10. Schmitt N, Liu Y, Benteibibel SE, Ueno H. 2016. Molecular mechanisms regulating T helper 1 versus T follicular helper cell differentiation in humans. *Cell Rep* 16:1082–1095. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.063>.
11. Donnarumma T, Young GR, Merkenschlager J, Elsmund U, Bongard N, Nutt SL, Boyer C, Dittmer U, Le-Trilling VT, Trilling M, Bayer W, Kassiotis G. 2016. Opposing development of cytotoxic and follicular helper CD4 T cells controlled by the TCF-1-Bcl6 nexus. *Cell Rep* 17:1571–1583. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.013>.
12. Lu KT, Kanno Y, Cannons JL, Hannon R, Bible P, Elkhoulou AG, Anderson SM, Wei L, Sun H, O'Shea JJ, Schwartzberg PL. 2011. Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells. *Immunity* 35:622–632. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.015>.
13. Morita R, Schmitt N, Benteibibel SE, Ranganathan R, Bourdary L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabaghbaei N, Lavacchio EM, Punaro M, Pascual V, Bancharau J, Ueno H. 2011. Human blood CXCR3(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34:108–121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012>.
14. Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, Sallusto F, Tangye SG, Mackay CR. 2011. CXCR3 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol* 186:5556–5568. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002828>.
15. Pallikuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. 2012. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood* 120:985–993. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396648>.
16. Ma CS, Phan TG. 2017. Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. *Immunology* 152:382–387. <https://doi.org/10.1111/imm.12793>.
17. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, Donlin LT, Henderson LA, Wei K, Mizoguchi F, Teslovich NC, Weinblatt ME, Massarotti EM, Coblyn JS, Hallgott SM, Lee YC, Todd DJ, Byrnes VP, Goodman SM, Pernis AB, Ivashkiv LB, Karlson EW, Nigrovic PA, Filer A, Buckley CD, Lederer JA, Raychaudhuri S, Brenner MB. 2017. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 542:110–114. <https://doi.org/10.1038/nature20810>.
18. Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, Schwartzberg PL, Cook MC, Walters GD, Vinuesa CG. 2009. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 206:561–576. <https://doi.org/10.1084/jem.20081886>.
19. Benteibibel SE, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, Flano E, Mojias A, Albrecht RA, Blankenship D, Xu H, Pascual V, Bancharau J, Garcia-Sastre A, Palucka AK, Ramilo O, Ueno H. 2013. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody

- responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* 5:176ra32. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005191>.
20. Hait A, Schmitz F, G rdts S, Flach B, Moore MS, Perkins JA, Robins HS, Aderem A, Spearman P, Tomaras GD, De Rosa SC, McElrath MJ. 2017. Vaccination establishes clonal relatives of germinal center T cells in the blood of humans. *J Exp Med* 214:2139–2152. <https://doi.org/10.1084/jem.20161794>.
 21. Asir A, Aloulou M, Gador M, P rals C, Fazilleau N. 2017. Interconnected subsets of memory follicular helper T cells have different effector functions. *Nat Commun* 8:847. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00843-7>.
 22. Schultz BT, Teigler JE, Pissani F, Oster AF, Kranias G, Alter G, Marovich M, Eller MA, Dittmer U, Robb ML, Kim JH, Michael NL, Bolton D, Str eck H. 2016. Circulating HIV-specific interleukin-21(+)CD4(+) T cells represent peripheral Tfh cells with antigen-dependent helper functions. *Immunity* 44:167–178. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.011>.
 23. Locci M, Havanar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kronika MA, Arlehamn CL, Su LF, Cubas R, Davis MM, Sette A, Haddad EK, International AIDS Vaccine Initiative Protocol C Principal Investigators, Poignard P, Crotty S. 2013. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39:758–769. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.031>.
 24. Cohen K, Altfield M, Alter G, Stamatatos L. 2014. Early preservation of CXCR5+ PD-1+ helper T cells and B cell activation predict the breadth of neutralizing antibody responses in chronic HIV-1 infection. *J Virol* 88:13310–13321. <https://doi.org/10.1128/JVI.02186-14>.
 25. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, Flanders MD, Cutler S, Yudanin N, Muller MI, Davis I, Farber D, Hartjen P, Haag F, Alter G, Schulze zur Wiesch JS, Str eck H. 2012. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest* 122:3271–3280. <https://doi.org/10.1172/JCI64314>.
 26. Perreau M, Savoye AL, De Grinis E, Corpeaux JM, Cubas R, Haddad EK, De Laval L, Graziosi C, Pantaleo G. 2013. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210:143–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>.
 27. Doernick EK, Chan A, Ma CS, Gatto D, Schwartzberg PL, Brink R, Tangye SG. 2010. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* 33:241–253. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.015>.
 28. Fahay LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavem DB, Brooks DG. 2011. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* 208:987–999. <https://doi.org/10.1084/jem.20101773>.
 29. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, Ambrozak DR, Sandler NG, Timmer KJ, Sun X, Pan L, Pohlolik A, Rao SS, Branchley JM, Alam SM, Tomaras GD, Roederer M, Douek DC, Soder RA, Germain RN, Haddad EK, Koup RA. 2012. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* 122:3281–3294. <https://doi.org/10.1172/JCI63039>.
 30. Klett NR, Vinton CL, Lynch RM, Canary LA, Ho J, Darrah PA, Estes JD, Soder RA, Moir SL, Branchley JM. 2011. SIV infection of rhesus macaques results in dysfunctional T- and B-cell responses to neo and recall Leishmania major vaccination. *Blood* 118:5803–5812. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365874>.
 31. Xu Y, Weatherall C, Bailey M, Alcantara S, De Rose R, Estaquier J, Wilson K, Suzuki K, Corbell J, Cooper DA, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders J. 2013. SIV infects follicular helper CD4 T cells in lymphoid tissues during pathogenic infection of pigtail macaques. *J Virol* 87:3760–3773. <https://doi.org/10.1128/JVI.02497-12>.
 32. Amet T, Son YM, Jiang L, Cheon IS, Huang S, Gupta SK, Dent AL, Montaner LJ, Yu Q, Sun J. 2017. BCL6 represses antiviral resistance in follicular T helper cells. *J Leukoc Biol* 102:527–536. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A1216-5138R>.
 33. Hong JJ, Amancha PK, Rogers K, Ansari AA, Villinger F. 2012. Spatial alterations between CD4(+) T follicular helper, B, and CD8(+) T cells during simian immunodeficiency virus infection: T/B cell homeostasis, activation, and potential mechanism for viral escape. *J Immunol* 188:3247–3256. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103138>.
 34. Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, Park H, Matsuda K, Bao JY, Hagen SL, Shoemaker R, Deleage C, Lucero C, Morcock D, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, Hesselgesser J, Gelezianus R, Hirsch VM, Edlowski PT, Piatek M, Jr, Estes JD, Lifson JD, Pickler LJ. 2015. B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat Med* 21:132–139. <https://doi.org/10.1038/nm.3781>.
 35. Pallikuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, Stevenson M, Pahwa S. 2015. Peripheral T follicular helper cells are the major HIV reservoir within central memory CD4 T cells in peripheral blood from chronically HIV-infected individuals on combination antiretroviral therapy. *J Virol* 90:2718–2728. <https://doi.org/10.1128/JVI.02883-15>.
 36. Banga R, Procopio FA, Noto A, Pollakis G, Cavassini M, Ohmiti K, Corpeaux JM, de Laval L, Pantaleo G, Perreau M. 2016. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med* 22:754–761. <https://doi.org/10.1038/nm.4113>.
 37. Fogelman I, Davey V, Ochs HD, Elashoff M, Feinberg MB, Mican J, Siegel JP, Sneller M, Lane HC. 2000. Evaluation of CD4+ T cell function in vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *J Infect Dis* 182:435–441. <https://doi.org/10.1086/315739>.
 38. Moir S, Fanci AS. 2017. B-cell responses to HIV infection. *Immunol Rev* 275:33–48. <https://doi.org/10.1111/imr.12502>.
 39. Cubas RA, Mudd JC, Savoye AL, Perreau M, van Groenynghoe J, Metcalf T, Connick E, Meditz A, Freeman GJ, Abesada-Terk G, Jr, Jacobson JM, Brooks AD, Crotty S, Estes JD, Pantaleo G, Lederman MM, Haddad EK. 2013. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19:494–499. <https://doi.org/10.1038/nm.3109>.
 40. Bussmann BM, Reiche S, Bieniek B, Krznaric I, Ackermann F, Jassoy C. 2010. Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. *Virology* 397:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.003>.
 41. van Gils MJ, Sanders RW. 2013. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: templates for a vaccine. *Virology* 435:46–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.004>.
 42. Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15:866–870. <https://doi.org/10.1038/nm.1949>.
 43. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4144–4149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630530100>.
 44. Haynes BF, Kelsoe G, Harrison SC, Kepler TB. 2012. B-cell lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nat Biotechnol* 30:423–433. <https://doi.org/10.1038/nbt.2197>.
 45. Wu X, Zhou T, Zhu J, Zhang B, Georgiev I, Wang C, Chen X, Longo NS, Louder M, McKee K, O'Dell S, Peretto S, Schmidt SD, Shi W, Wu L, Yang Y, Yang ZY, Yang Z, Zhang Z, Bonsignori M, Crump JA, Kapiga SH, Sam NE, Haynes BF, Simsek M, Burton DR, Koff WC, Doria-Rose NA, Connors M, NISC Comparative Sequencing Program, Mulliken JC, Nabel GJ, Roederer M, Shapiro L, Kwong PD, Mascola JR. 2011. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333:1593–1602. <https://doi.org/10.1126/science.1207532>.
 46. Walker BD, Yu XG. 2013. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol* 13:487–498. <https://doi.org/10.1038/nri3478>.
 47. Chakrabarti LA, Simon V. 2010. Immune mechanisms of HIV control. *Curr Opin Immunol* 22:488–496. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.06.006>.
 48. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. 2009. Prevalence and comparative characteristics of long-term non-progressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 23:1163–1169. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832b44c8>.
 49. Sáez-Cir  n A, Lacabaretz C, Lambotte O, Versmisse P, Umutia A, Boufassa F, Barré-Sinoussi F, Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G, Venet A, ANRS EP36 HIV Controllers Study Group. 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar CTL activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6776–6781. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>.
 50. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, Larsen M, Pancino G, Douek DC, Autran B, Sáez-Cir  n A, Appay V. 2009. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113:6351–6360. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206557>.
 51. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, Sakaly RP. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198:1909–1922. <https://doi.org/10.1084/jem.20031598>.
 52. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Perera F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, Palmer S, Brockman M, Rathod A, Piechocka-Trocha A, Baker B, Zhu B,

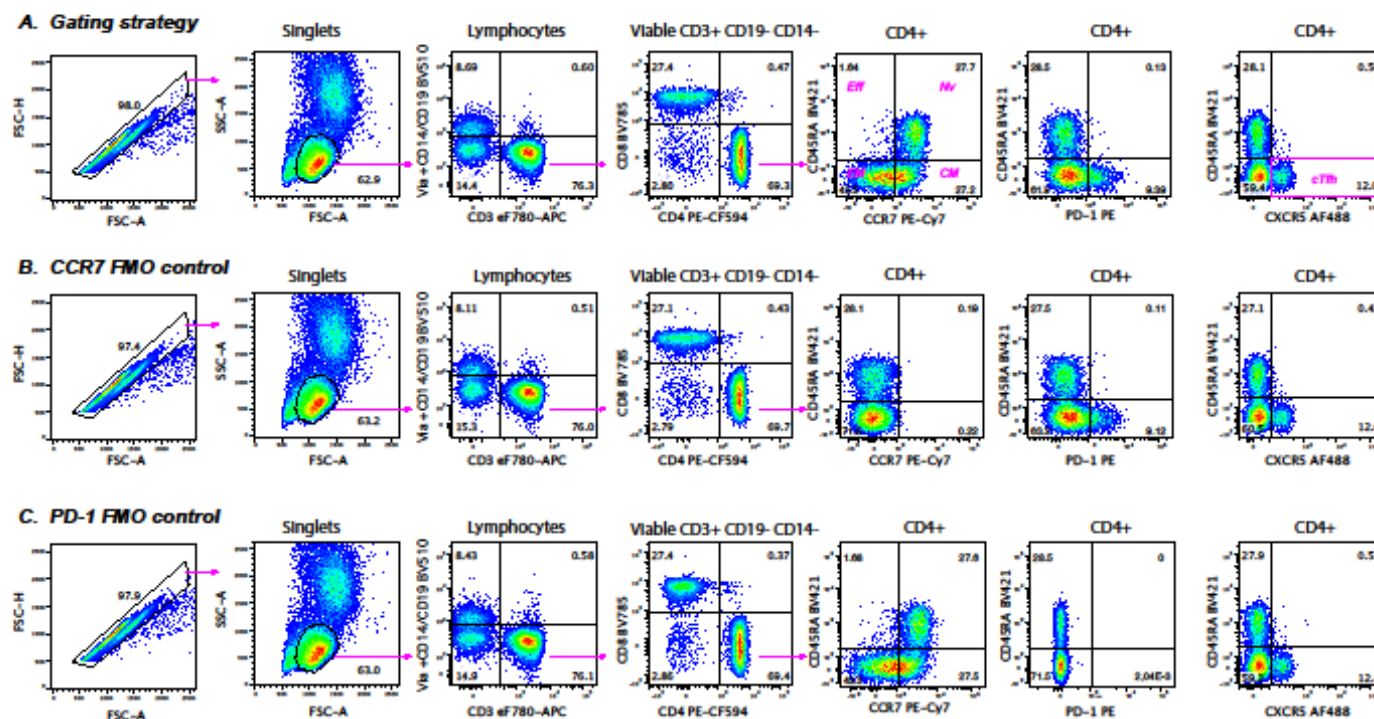
- Le Gall S, Waring MT, Ahern R, Moss K, Kallouh AD, Coffin JM, Freeman GJ, Rosenberg ES, Walker BD. 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 8:1246–1254. <https://doi.org/10.1038/nri1515>.
53. Benati D, Galperin M, Lambotte O, Gras S, Lim A, Mukhopadhyay M, Noul   A, Campbell KA, Lemerrier B, Claireaux M, Hendou S, Lechat P, de Truchis P, Boufassa F, Rossjohn J, Delfraissy JF, Arenzana-Seisdedos F, Chakrabarti LA. 2016. Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J Clin Invest* 126:2093–2108. <https://doi.org/10.1172/JCI83792>.
54. Pereyra F, Palmer S, Miura T, Block BL, Wiegand A, Rothchild AC, Baker B, Rosenberg R, Cutrell E, Seaman MS, Coffin JM, Walker BD. 2009. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J Infect Dis* 200:984–990. <https://doi.org/10.1093/infdis/jin146>.
55. Guan Y, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Fouts TR, Dimitrov A, Zhang Z, Redfield RR, DeVico AL, Gallo RC, Lewis GK. 2009. Discordant memory B cell and circulating anti-Env antibody responses in HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3952–3957. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813392106>.
56. Buckner CM, Kardava L, Zhang X, Gittens K, Justement JS, Kovacs C, McDermott AB, Li Y, Sajadi MM, Chun TW, Fauci AS, Moir S. 2016. Maintenance of HIV-specific memory B-cell responses in elite controllers despite low viral burdens. *J Infect Dis* 214:390–398. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv163>.
57. Rouers A, Klingler J, Su B, Samri A, Laumond G, Even S, Avettand-Fenoel V, Richetta C, Paul N, Boufassa F, Hocqueloux L, Mouquet H, Rouzioux C, Lambotte O, Autran B, Graff-Dubois S, Moog C, Moris A, ANRS CO21 Cohort. 2017. HIV-specific B cell frequency correlates with neutralization breadth in patients naturally controlling HIV-infection. *EbioMedicine* 21:158–169. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.029>.
58. Ma CS, Doernick EK. 2014. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol Cell Biol* 92:64–71. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.55>.
59. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, Cosimi LA, Addo MM, Lichterfeld M, Altfeld M, Frahm N, Brander C, Sette A, Walker BD, Rosenberg ES. 2004. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol* 78:4463–4477. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4463-4477.2004>.
60. Ransinghe S, Flanders M, Cutler S, Soghoian DZ, Ghebremichael M, Davis L, Lindqvist M, Pereyra F, Walker BD, Heckerman D, Streeck H. 2012. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have distinct associations with viral load and clinical outcome. *J Virol* 86:277–283. <https://doi.org/10.1128/JVI.05577-11>.
61. Vingert B, Perez-Patrig  on S, Jeannin P, Lambotte O, Boufassa F, Lemaitre F, Kwok WW, Theodorou I, Delfraissy JF, Th  ze J, Chakrabarti LA, ANRS EP36 HIV Controllers Study Group. 2010. HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog* 6:e1000780. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000780>.
62. Douek DC, Branchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kunzmann K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Owens A, Price DA, Connors M, Koup RA. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417:95–98. <https://doi.org/10.1038/417095a>.
63. Seaman MS, James H, Hawkins N, Grandpre LE, Devoy C, Giri A, Coffey RT, Harris L, Wood B, Daniels MG, Bhattacharya T, Lapedes A, Polonis VR, McCutchan FE, Gilbert PB, Self SG, Korber BT, Montefiori DC, Mascola JR. 2010. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J Virol* 84:1439–1452. <https://doi.org/10.1128/JVI.02108-09>.
64. Deeks SG, Schwaighardt B, Wrin T, Galovich J, Hoh R, Sinclair E, Hunt P, McCune JM, Martin JN, Potropoulos CJ, Hecht FM. 2006. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* 80:6155–6164. <https://doi.org/10.1128/JVI.00093-06>.
65. Chavale KM, Merry E, Ehrnstein MR. 2015. Cutting edge: circulating plasmablasts induce the differentiation of human T follicular helper cells via IL-6 production. *J Immunol* 194:2482–2485. <https://doi.org/10.1093/jimmunol.1401100>.
66. Aubertin AM, Le Grand R, Wang Y, Beyer C, Tao L, N  ldez O, Barré Sinoussi F, Hurler B, Moog C, Lehner T, Girard M. 2000. Generation of CD8+ T cell-generated suppressor factor and beta-chemokines by targeted iliac lymph node immunization in rhesus monkeys challenged with SHIV-89.6P by the rectal route. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:381–392. <https://doi.org/10.1089/088922200309260>.
67. Porichis F, Kaufmann DE. 2011. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS* 6:174–180. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e3283454058>.
68. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. 2013. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* 14:1212–1218. <https://doi.org/10.1038/nri.2762>.
69. Sauce D, Almeida JR, Larsen M, Haro L, Autran B, Freeman GJ, Appay V. 2007. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* 21:2005–2013. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282a0e548>.
70. Youngblood B, Noto A, Porichis F, Akondy RS, Ndlovu ZM, Austin JW, Bordin R, Procopio FA, Miura T, Allen TM, Sidney J, Sette A, Walker BD, Ahmed R, Boss JM, Sekaly RP, Kaufmann DE. 2013. Cutting edge: prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. *J Immunol* 191:540–544. <https://doi.org/10.1093/jimmunol.1203161>.
71. Hatano H, Yuki SA, F  rre AL, Graf EH, Somsouk M, Sinclair E, Abdel-Mohsen M, Liegler T, Harvill K, Hoh R, Palmer S, Bacchetti P, Hunt PW, Martin JN, McCune JM, Tracy RP, Busch MP, O'Doherty U, Shadlett BL, Wong JK, Deeks SG. 2013. Prospective antiretroviral treatment of asymptomatic HIV-1 infected controllers. *PLoS Pathog* 9:e1003691. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003691>.
72. Martin-Gayo E, Cronin J, Hickman T, Ouyang Z, Lindqvist M, Kolb KE, Schulze zur Wiesch J, Cubas R, Porichis F, Shalek AK, van Lunzen J, Haddad EK, Walker BD, Kaufmann DE, Lichterfeld M, Yu XG. 2017. Circulating CXCR3+CXCR3+PD-1   Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight* 2:e89574. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89574>.
73. Buranapraditkun S, Pissani F, Teigler JE, Schultz BT, Altar G, Marovich M, Robb ML, Eller MA, Martin J, Deeks S, Michael NL, Streeck H. 2017. Preservation of peripheral T follicular helper cell function in HIV controllers. *J Virol* 91:e00497-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00497-17>.
74. Schaid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pletsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC. 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458:636–640. <https://doi.org/10.1038/nature07930>.
75. Cubas R, van Greveninghe J, Wills S, Kardava L, Santich BH, Buckner CM, Muir R, Tardif V, Nichols C, Procopio F, Ho Z, Matcalf T, Ghnaim K, Locci M, Ancuta P, Routy JP, Trautmann L, Li Y, McDermott AB, Koup RA, Petrovas C, Migueles SA, Connors M, Tomaras GD, Moir S, Crotty S, Haddad EK. 2015. Reversible reprogramming of circulating memory T follicular helper cell function during chronic HIV infection. *J Immunol* 195:5625–5636. <https://doi.org/10.1093/jimmunol.1501524>.
76. Vingert B, Benati D, Lambotte O, de Truchis P, S  ma L, Jeannin P, Galperin M, Perez-Patrig  on S, Boufassa F, Kwok WW, Lemaitre F, Delfraissy JF, Th  ze J, Chakrabarti LA. 2012. HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J Virol* 86:10661–10674. <https://doi.org/10.1128/JVI.00056-12>.
77. Fernandez S, Tanaskovic S, Holbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, Beard M, Purcell D, Lewin SR, Price P, French MA. 2011. CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. *J Infect Dis* 204:1927–1935. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir659>.
78. Harker JA, Lewis GM, Mack L, Zuniga EI. 2011. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* 334:825–829. <https://doi.org/10.1126/science.1208421>.
79. Jabado N, Pallier A, Le Deist F, Bernard F, Fischer A, Hivroz C. 1997. CD4 ligands inhibit the formation of multifunctional transduction complexes involved in T cell activation. *J Immunol* 158:94–103.
80. Bogers W, Barnett SW, Oostermeijer H, Nieuwenhuis IG, Boenhakker N, Mortier D, Mooij P, Koopman G, Remarque E, Martin G, Lai RP, Doy AK, Sun Y, Burke B, Ferrari G, Montefiori D, Martin L, Davis D, Srivastava I, Hoensy JL. 2017. Increased, durable B-cell and ADCC responses asso-



- ciated with T-helper responses to HIV-1 envelope in macaques vaccinated with gp140 occluded at the CD4 receptor binding site. *J Virol* 91:e00811-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00811-17>.
81. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Roussseau C, Coovadia H, Mullins J, Heckerman D, Walker BD, Goulder P. 2007. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13:46–53. <https://doi.org/10.1038/nm1520>.
 82. Ranasinghe S, Soghoian DZ, Lindqvist M, Ghebremichael M, Donaghey F, Carrington M, Seaman MS, Kaufmann DE, Walker BD, Porichis F. 2015. HIV-1 antibody neutralization breadth is associated with enhanced HIV-specific CD4+ T cell responses. *J Virol* 90:2208–2220. <https://doi.org/10.1128/JVI.02278-15>.
 83. Nabi G, Genant-Bonsmann MS, Tenbusch M, Gardt O, Barouch DH, Temchura V, Überla K. 2013. GagPol-specific CD4(+) T-cells increase the antibody response to Env by intrastructural help. *Retrovirology* 10:117. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-117>.
 84. Störcksdieck genant-Bonsmann M, Nizzold T, Temchura V, Pissani F, Ehrhardt K, Brown EP, Osai-Owusu NY, Hannaman D, Hengel H, Ackerman ME, Streock H, Nabi G, Tenbusch M, Überla K. 2015. Enhancing the quality of antibodies to HIV-1 envelope by GagPol-specific Th cells. *J Immunol* 195:4861–4872. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501377>.
 85. Li M, Gao F, Mascola JR, Stamatatos L, Polonis VR, Koutsoukos M, Voss G, Goepfert P, Gilbert P, Greene KM, Biliska M, Kotha DL, Salazar-Gonzalez JF, Wei X, Decker JM, Hahn BH, Montefiori DC. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol* 79:10108–10125. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10108-10125.2005>.
 86. Pialoux G, Excler JL, Riviere Y, Gonzalez-Canali G, Feuillie V, Coulaud P, Gluckman JC, Matthews TJ, Maignier B, Kieny MP, Gonnet P, Diaz I, Méric C, Paoletti E, Tartaglia J, Salomon H, Plotkin S. 1995. A prime-boost approach to HIV preventive vaccine using a recombinant canarypox virus expressing glycoprotein 160 (MN) followed by a recombinant glycoprotein 160 (MN/LAI). The AGS Group and l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:373–381. <https://doi.org/10.1089/aid.1995.11.373>.
 87. Krell T, Greco F, Engel O, Dubayle J, Dubayle J, Kennel A, Charlotiaux B, Brassat R, Chevalier M, Sodayar R, El Habib R. 2004. HIV-1 gp41 and gp160 are hyperthermostable proteins in a mesophilic environment. Characterization of gp41 mutants. *Eur J Biochem* 271:1566–1579. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04068.x>.
 88. Mekdad HE, Boutant E, Karnib H, Biedma ME, Sharma KK, Malyska I, Laumond G, Roy M, Real E, Paillart JC, Moog C, Darlix JL, Maly Y, de Rocquigny H. 2016. Characterization of the interaction between the HIV-1 Gag structural polyprotein and the cellular ribosomal protein L7 and its implication in viral nucleic acid remodeling. *Retrovirology* 13:54. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0287-4>.

Résultats

M. Claireaux et al.

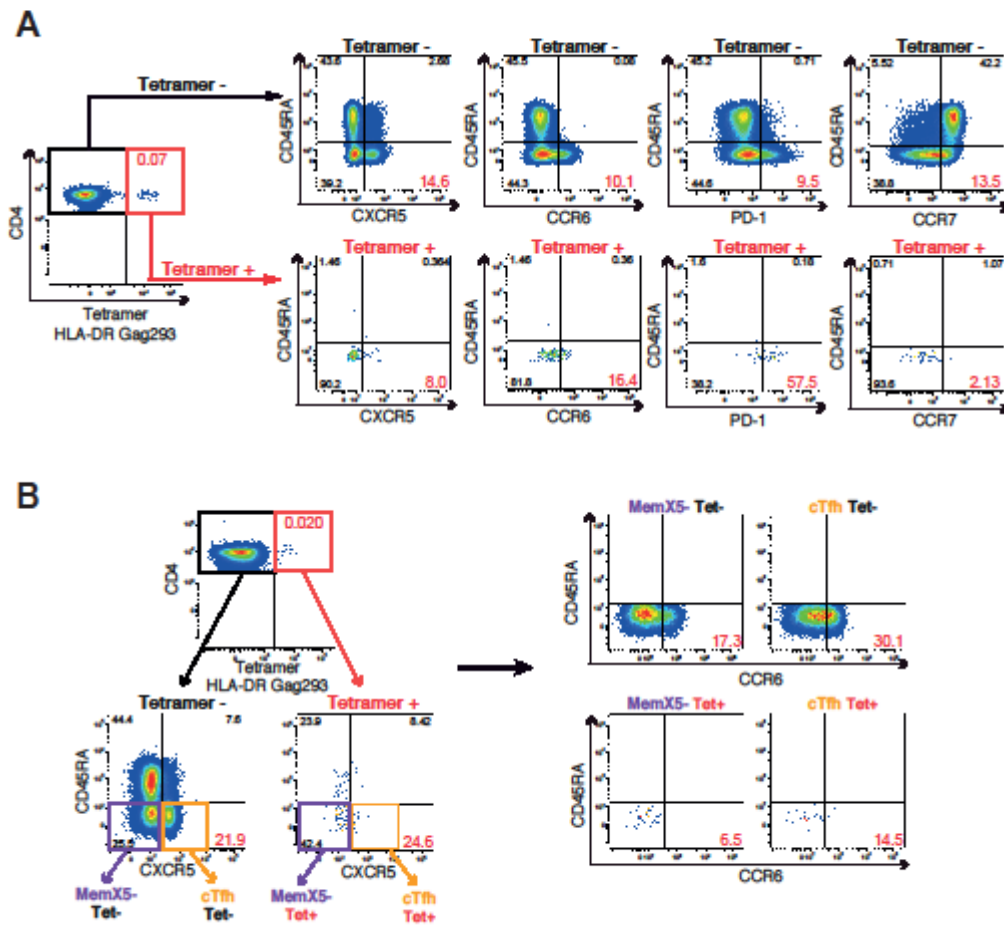


Supplemental Figure S1: Gating strategy and FMO controls for cTfh phenotyping

(A) CD4⁺ T cells were analyzed by gating the singlet viable CD14⁻ CD19⁻ CD3⁺ CD4⁺ lymphocyte population. The gate for the CCR7 marker was set on a CD45RA/CCR7 dot plot, which enabled a clear distinction between naive (Nv; CD45RA⁺ CCR7⁺) and memory subsets. The three memory subsets, including the central memory (CM; CD45RA⁻ CCR7⁺), effector memory (EM; CD45RA⁺ CCR7⁻), and advanced effector (Eeff; CD45RA⁺ CCR7⁻) subsets are reported. Similarly, gates for the PD-1 and CXCR5 markers were set on dot plots in function of the CD45RA parameter, which enabled a clear distinction between the positive and negative populations (2 rightmost dot plots).

(B, C) "Fluorescence minus one" (FMO) controls were obtained by omitting a single antibody from the labeling antibody cocktail. Analysis of FMO controls for CCR7 (B) and PD-1 (C) showed that omitting one marker did not significantly change the frequency of positive cells for other markers, confirming the validity of the compensation matrix and of the gating strategy.

M. Claireaux et al.



Supplemental Figure S2: Gating strategy for the analysis of HIV-specific CD4+ T cell populations

(A) Example of gating used to analyze HIV-specific CD4+ T populations in one HIV controller.

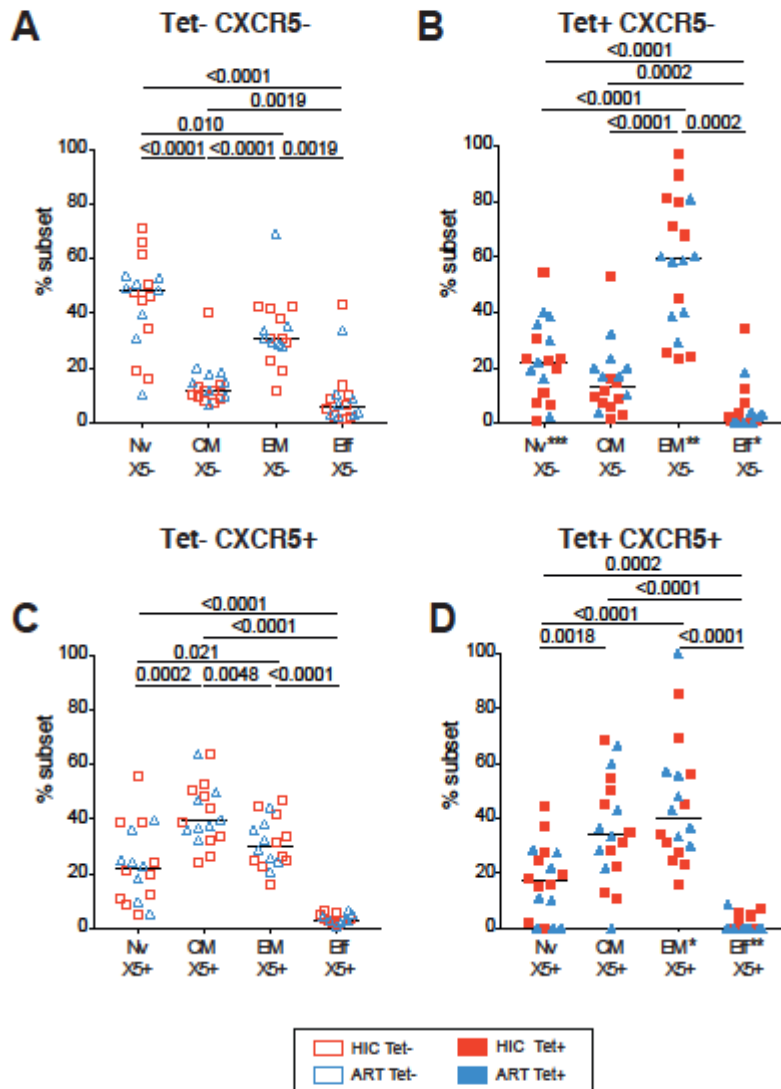
Left: HIV-specific CD4+ T cells were detected by labeling with an MHC-II tetramer loaded with the Gag293 peptide.

Right: Plots depicting how the gates were set for the analysis of CCR6, PD-1, and CCR7 expression in the Gag293-specific (bottom row) and non-specific (top row) CD4+ T cells populations. The CXCR5, CCR6, PD-1 and CCR7 gates were set based on differential expression in the CD45RA+ and CD45RA- populations

(B) Example of CCR6 expression analysis in Gag293-specific and non-specific CD4+ T cells from a treated patient.

Left: Gating strategy used to analyze HIV-specific CD4+ T cells. Top: plot illustrating the detection of Gag293-specific CD4+ T cells by MHC-II tetramer labeling in a treated patient. Bottom: Gates used to select the Mem X5- (CD45RA- CXCR5-; purple) and cTfh (CD45RA- CXCR5+; orange) subsets in Gag293-specific (Tetramer+) and non-specific (Tetramer-) CD4+ T cells populations.

Right: Plots comparing CCR6 expression in the MemX5- (right) and cTfh (left) subsets, in both the non-specific (Tet-, top) and specific (Tet+, bottom) CD4+ T cell populations.



Supplemental Figure S3: Distribution of naive and memory subsets in Gag293-specific and non-specific CD4+ T cells differs depending on CXCR5 expression

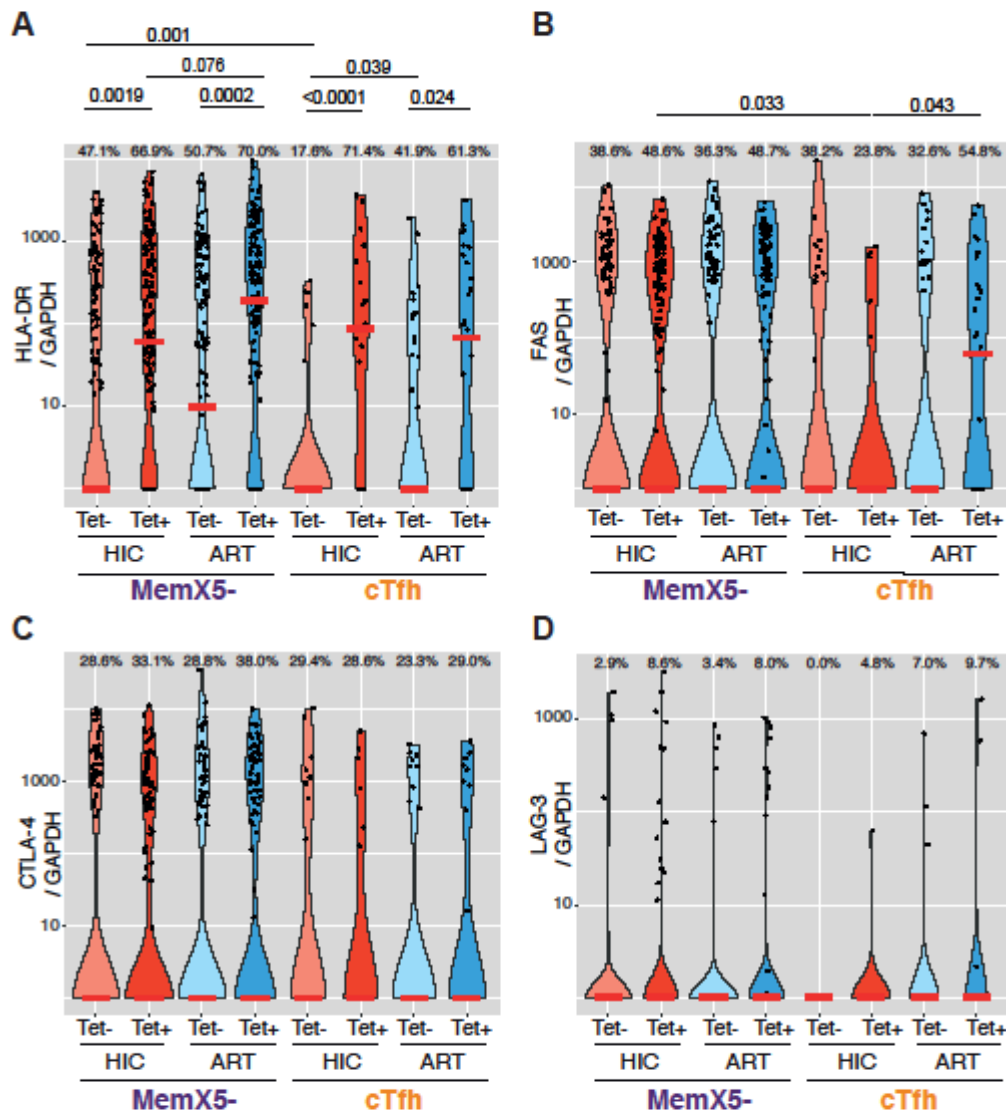
Gag293-specific (Tet+) and non-specific (Tet-) CD4+ T cells expressing CXCR5 (X5+) or not (X5-) were analyzed for the distribution of the 4 following subsets: Naive (Nv; CD4RA+ CCR7+), central memory (CM; CD45RA- CCR7+), effector memory (EM; CD45RA- CCR7-), and effector (Eff; CD45RA+ CCR7-). Analyses were carried out in cells from HIV Controllers (HIC, n=10) and treated patients (ART, n=8). As no significant differences were found in subset distribution between the HIC and ART groups, data from both groups were pooled and plotted together.

(A) Non-specific CXCR5- CD4+ T cells. (B) Gag293-specific CXCR5- CD4+ T cells.

(C) Non-specific CXCR5+ CD4+ T cells. (D) Gag293-specific CXCR5+ CD4+ T cells.

P-values for significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Mann-Whitney U test between subsets on the same graph are reported on each graph. Significant inter-graph differences obtained by the Mann-Whitney U Test between Tet- and Tet+ matching subsets are indicated by stars next to the subset name on panel C (Tet- X5- vs Tet+ X5-) or D (Tet- X5+ vs Tet+ X5+): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

M. Claireaux et al.

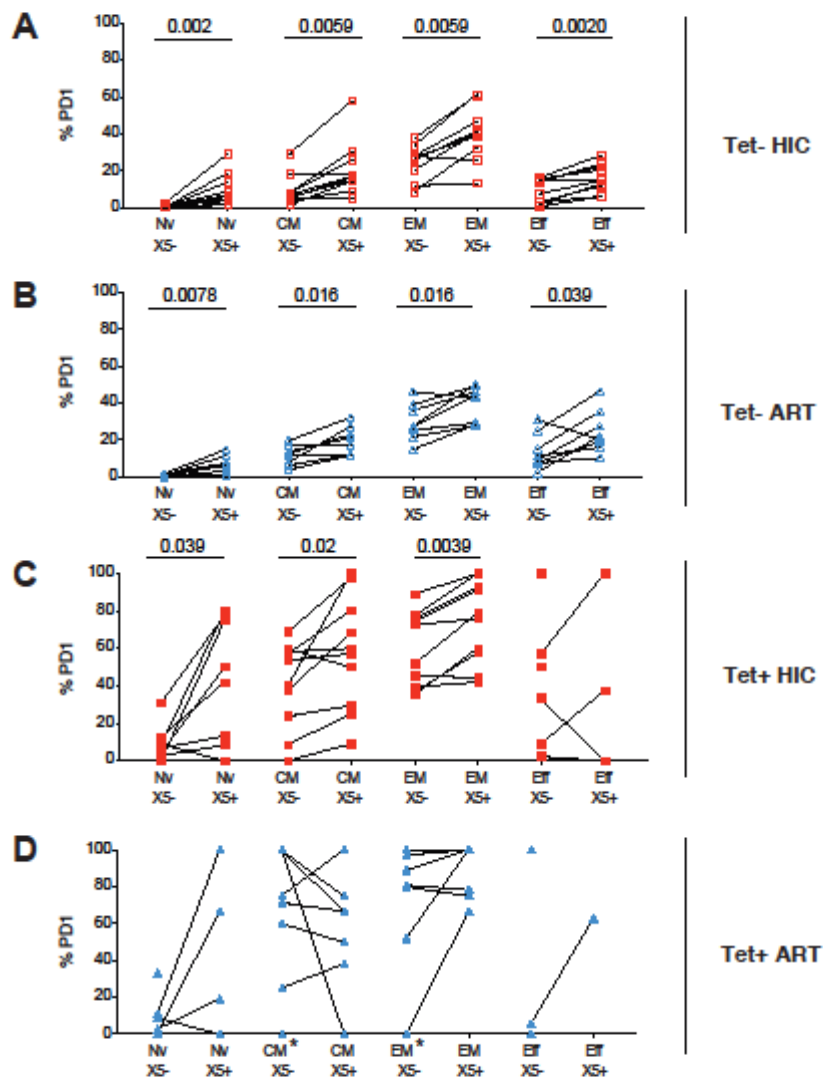


Supplemental Figure S4: Expression of activation and exhaustion markers in HIV-specific and non-specific CD4+ T cell subsets

(A) HLA-DR, (B) FAS, (C) CTLA-4, and (D) LAG-3 mRNA expression was measured in sorted Gag283-specific (Tet+) and non-specific (Tet-) CD4+ T cell subsets. Reverse-transcribed mRNA was quantitated at the single cell level by quantitative real-time PCR on a microfluidics C1 chip (Fluidigm), as per manufacturer's instructions. Gene expression normalized to that of the housekeeping gene GAPDH and multiplied by a factor 10,000 is reported. The analysis was carried out on cells collected from 9 HIC and 9 ART patients. The number of cells analyzed was ≥ 140 for each group in the MemX5 subset and ≥ 21 for each group in the cTfh subset. Violin plots visualize the distribution of the dataset. Median values are indicated by red bars. The percentage of positive cells (with a normalized gene expression > 10) is indicated above each plot. P values obtained by the Mann-Whitney U test are reported.

Résultats

M. Claireaux et al.



Supplemental Figure S5: PD-1 expression in naive and memory subsets of Gag293-specific and non-specific CD4+ T cells differs depending on CXCR5 expression

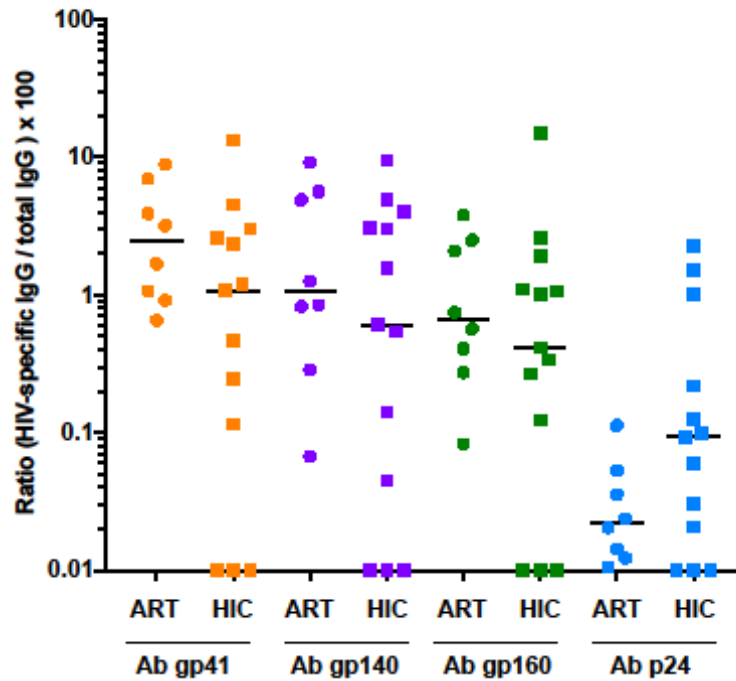
The frequency of PD-1 expressing cells was analyzed in subsets of Gag293-specific (Tet+) and non-specific (Tet-) CD4+ T cells expressing CXCR5 (X5+) or not (X5-). PD-1 expression was measured in the 4 following subsets: Naive (Nv; CD4RA+ CCR7+), central memory (CM; CD45RA- CCR7+), effector memory (EM; CD45RA- CCR7-), and effector (Eff; CD45RA+ CCR7-). Analyses were carried out in cells from HIV controllers (HIC, n=10) and treated patients (ART, n=8). Tet+ Nv and Eff data points with too few cells for analysis are not represented.

(A) Non-specific CD4+ T cells from HIC patients. (B) Non-specific CD4+ T cells from ART patients.

(C) Gag293-specific CD4+ T cells from HIC patients. (D) Gag293-specific CD4+ T cells from ART patients.

P-values for significant differences ($P < 0.05$) obtained by the Wilcoxon matched-pairs test between X5- and X5+ matched subsets are reported on each graph. Significant inter-graph differences obtained by the Mann-Whitney U Test between Tet+ HIC and Tet+ ART matching subsets are indicated by stars next to the subset name on panel D: * $p < 0.05$.

M. Claireaux et al.

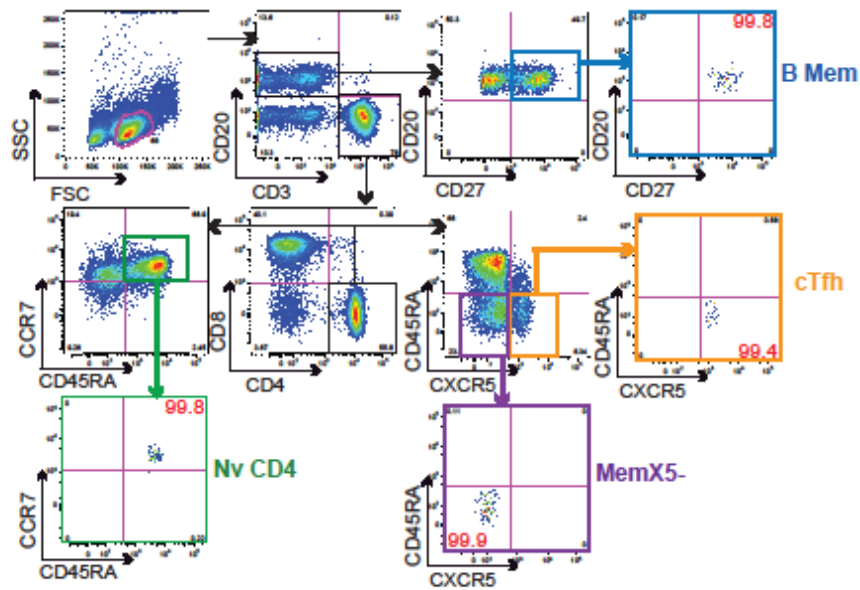


Supplemental Figure S6: HIV-specific antibodies in patient plasma

Antibodies specific for HIV-1 gp41 S30, gp140 and gp160 MN/LAI, and p24 Gag were measured by ELISA in patient plasma. The ratio of HIV-specific antibody concentration to the total IgG concentration in plasma, multiplied by 100 is reported. Ratios for undetectable HIV-specific antibodies were assigned a threshold value of 0.01. Median values are indicated by black bars.

Résultats

M. Claireaux et al.

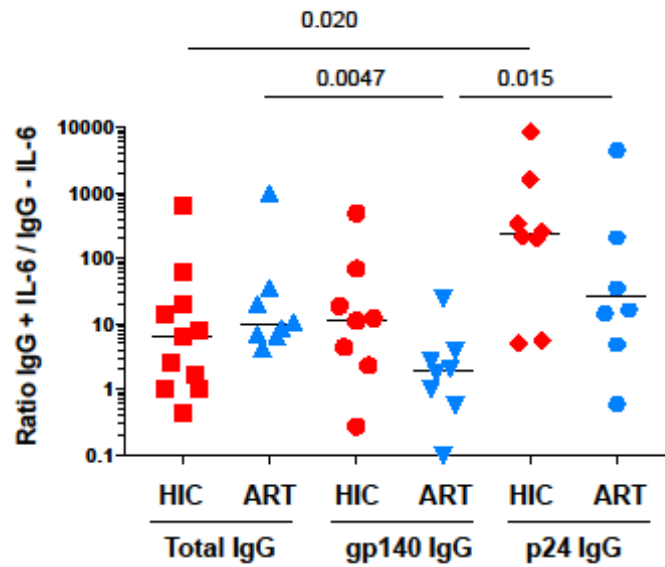


Supplemental figure S7: Gating strategy used for sorting CD4+ T cell and B cell subsets.

Flow cytometry plots showing the gating strategy used for sorting cTfh cells (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA- CXCR5+; orange), MemX5- (CD3 CD20- CD4+ CD45RA- CXCR5-; purple), naive CD4+ T cells (CD3+ CD20- CD4+ CD45RA+ CCR7+; green), and memory B cells (CD3- CD20+ CD27+; blue) among live singlet PBMC. A representative example from a healthy donor sample pre- and post-sort is shown. Post-sort sample plots are outlined with the color corresponding to the different cellular subsets.

Résultats

M. Claireaux et al.



Supplemental Figure S8: Effect of IL-6 on IgG secretion in cTfh/B cell cocultures

cTfh cells and memory B cells were cocultivated in the presence of superantigens SEA + SEE for 12 days. Supernatants were assessed for the presence of total IgG, IgG specific for HIV Env gp140, and IgG specific for HIV capsid protein Gag p24. The ratio of IgG obtained with IL-6 supplementation to IgG obtained without IL-6 is reported for cocultures of cells from HIV controllers (HIC) and treated patients (ART). Significant differences ($P < 0.05$) obtained with the Mann-Whitney U test are reported.

Résultats

M. Clairoux et al.

A	Patient group	Duration of infection years	Viral load HIV-1 copies/mL	CD4 /mm³	Nadir of CD4+ T cells /mm³	Duration of antiretroviral treatment
	HIC	16.3 [7.6 - 27.7]	< 50	944 [315 - 1333]	N/A	N/A
	ART	13.8 [8.9 - 27.8]	< 50	615 [211 - 987]	64 [10 - 450]	9.5 [6.4 - 26.1]
	P value* HIC vs ART	N.S.	N.S.	P<0.01	-	-

B	Patient ID	Duration of infection years	Viral load HIV-1 copies/mL	CD4 /mm³	HLA-DR typing	HLA-DR tetramer used
	HIC01	23.9	<50	1333	DR1, DR11	DR11
	HIC02	16.3	<50	944	DR11, DR12	DR11
	HIC03	9.0	<50	1252	DR14, DR16, DRB5	DRB5
	HIC04	27.4	<50	1030	DR15, DRB5	DRB5
	HIC05	27.1	<50	1000	DR11, DR15, DRB5	DR11
	HIC06	10.8	<50	1016	DR8, DR13	DR13
	HIC07	8.3	<50	755	DR13, DR15, DRB5	DRB5
	HIC08	11.6	<50	744	DR7, DR15, DRB5	DRB5
	HIC09	20.0	<50	315	DR1, DR7	DR7
	HIC10	14.9	<50	1063	DR1, DR7	DR1
	HIC11	11.7	<50	747	DR9, DR13	
	HIC12	27.7	<50	929	DR14, DR15, DRB5	
	HIC13	21.7	<50	765	DR3, DR8	
	HIC14	18.9	<50	702	DR1, DR16	
	HIC15	7.6	<50	1190	DR3/DR7	
	Median	16.3	<50	944.0		

C	Patient ID	Duration of infection years	Viral load HIV-1 copies/mL	CD4 /mm³	HLA-DR typing	HLA-DR tetramer used
	ART01	9.0	<50	427	DR1, DR3	DR1
	ART02	19.0	<50	411	DR3, DR4	DR4
	ART03	8.9	<50	424	DR1, DR15, DRB5	DR1
	ART04	11.9	<50	417	DR15, DR16, DRB5	DRB5
	ART05	27.3	<50	615	DR1, DR7	DR1
	ART06	13.8	<50	211	DR15, DR16, DRB5	DR1
	ART07	25.9	<50	403	DR4, DR7	DR4*
	ART08	12.8	<50	754	DR9, DR16, DRB5	DRB5
	ART09	18.9	<50	328	DR1, DR13	
	ART10	15.4	<50	965	DR4, DR13	
	ART11	12.3	<50	987	DR1, DR1	
	ART12	27.8	<50	860	DR4, DR13	
	ART13	9.2	<50	730	DR7, DR13	
	ART14	9.7	<50	948	DR1, DR14	
	ART15	26.9	<50	754	DR8, DR16	
	Median	13.8	<50	615		

Supplemental Table S1: Clinical characteristics and HLA-DR typing of patients included in the study

15 HIV controllers (HIC) and 15 treated patient (ART) were included in the study.

(A) Summary of clinical characteristics of studied patients. Median values and ranges are reported. * P values estimated with the Mann-Whitney U test are reported. N.S.: not significant. N/A: not available.

(B, C) Clinical characteristics and HLA-DR typing of HIC (B) and ART (C) patients.

Patients included in the study were genotyped for HLA-DRB1. A subgroup of 10 HIC and 8 ART were analyzed with HLA-DR-matched MHC II tetramers loaded with the Gag293 peptide. The tetramers used for this analysis is reported in the rightmost column. The following tetramers were used: HLA DRB1*0101 (DR1), DRB1*00401 (DR4), DRB1*0405 (DR4*), DRB1*0701 (DR7), DRB1*1101 (DR11), DRB1*1302 (DR13), DRB1*1502 (DR15), and DRB5*0101 (DRB5).

M. Claireaux et al.

Supplemental Table S2 : Neutralizing capacity of HIV controller plasma

A- Plasma samples obtained at inclusion in the current study

Patient ID	Month	Tier 1		Tier 2						Tier 3	Control
		SF162	MW965.26	CH058	CH077	CH106	RHPA	THRO	REJO	TRJO	MLV
HIC01	M1	8131	2283	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC02	M1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC04	M1	7385	4342	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC05	M1	9738	3492	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC06	M1	1037	5164	69	96	<10	67	<10	<10	<10	<10
HIC07	M1	139	789	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC08	M1	1019	902	<10	31	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC10	M1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC11	M1	4911	3830	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC14	M1	58	164	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC15	M1	<10	94	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

B- Duplicate plasma samples collected in a previous study

Patient ID	Month	Tier 1		Tier 2						Tier 3	Control
		SF162	MW965.26	CH058	CH077	CH106	RHPA	THRO	REJO	TRJO	MLV
HIC02	M-44	10	ND	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC04	M-30	1000	ND	10	10	10	10	<10	<10	<10	10
HIC06	M-5	500	ND	80	80	<10	110	<10	<10	<10	10
HIC08	M-4	300	ND	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
HIC11	M-28	500	ND	10	10	<10	<10	<10	<10	<10	10

Titers of HIV neutralizing antibodies were determined in a TZM-bl-based assay. Patients plasma were tested for their capacity to neutralize 2 Tier 1 strains, 6 Tier 2 strains, 1 Tier 3 strain, and 1 control murine leukemia virus (MLV) MLV strain. The reciprocal of the inhibitory dilution 50 (ID50) is reported. Values >10 are considered significant.

(A) Neutralizing titers obtained at inclusion in the study.

(B) Neutralizing titers obtained for a subset of the same patients in retrospective plasma samples. The month of plasma collection is reported in the second column. ND: not done.

Publication 2

La fréquence de lymphocytes B spécifiques du VIH est corrélée à la puissance de neutralisation chez les patients contrôlant spontanément l'infection par le VIH

HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection

Angeline Rouers*, **Jérôme Klingler***, Bin Su, Assia Samri, Géraldine Laumond, Sophie Even, Véronique Avettand-Fenoel, Clemence Richetta, Nicodème Paul, Faroudy Boufassa, Laurent Hocqueloux, Hugo Mouquet, Christine Rouzioux, Olivier Lambotte, Brigitte Autran, Stéphanie Graff-Dubois, Christiane Moog, Arnaud Moris, Cohorte ANRS CO21

* : co-premier auteur

EBioMedicine, 2017

Des anticorps neutralisants à large spectre (capables de neutraliser un grand nombre de souches virales) ou *broadly neutralizing antibodies* (bnAbs) spécifiques au VIH ont été isolés à partir de sérums de patients présentant une virémie élevée, mais également chez des contrôleurs du VIH capables de contrôler spontanément la réplication du VIH-1 (maintenant une charge virale indétectable en l'absence de traitement). Chez ces patients contrôleurs (dénommés ici *elite controllers* (EC)), plusieurs paramètres contribuent à la suppression virale et notamment des facteurs génétiques et des réponses immunitaires particulières. Déterminer les réponses immunitaires associées au développement de bnAbs pourrait aider à concevoir des immunothérapies efficaces.

Dans cette étude, en collaboration avec le groupe d'A. Moris (INSERM U1135, CNRS ERL 8255, CIMI, Paris), notre équipe a participé au développement des techniques de caractérisation des compartiments de lymphocytes B mémoires et des réponses lymphocytes B mémoires spécifiques du VIH par cytométrie en flux et ELISPOT chez des EC de la cohorte CO21 CODEX de l'ANRS, positifs ou négatifs pour l'allèle protecteur HLA-B*57 (EC HLA-B*57+, n = 18 et EC HLA-B*57-, n = 19), que l'on a comparé à des patients infectés par le VIH et traités (n = 13) ainsi qu'à des individus non infectés par le VIH (n = 12).

Nous avons montré que les EC présentent des compartiments de lymphocytes B mémoires préservés et, contrairement aux patients ayant une charge virale indétectable suite à leur traitement par antirétroviraux, ont maintenu des réponses détectables de lymphocytes B

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH

mémoires spécifiques du VIH (réponses anticorps dirigés contre les protéines d'enveloppe du VIH-1). Tous les EC présentaient des lymphocytes B mémoires de sous-type IgG1 et de façon intéressante certains patients conservaient également de faibles réponses de sous-type IgG2 ou IgG3 spécifiques du VIH. De plus, j'ai réalisé des tests ELISA détectant les réponses IgG spécifiques du VIH des patients EC, montrant que les quantités d'IgG spécifiques du VIH ne sont pas corrélées à la fréquence des lymphocytes B spécifiques du VIH.

J'ai également analysé la capacité des sérums des EC à neutraliser dix souches de VIH-1, dont 8 souches difficiles-à-neutraliser tier-2 et 7 virus « transmis/fondateurs » (*transmitted/founder*, T/F, défini comme le variant ayant traversé la barrière épithéliale pour établir une nouvelle infection). Les virus T/F, isolés très tôt après l'infection, sont des virus récemment développés, particulièrement intéressants car correspondant aux virus transmis. Ce sont ces virus qu'il faudra inhiber par vaccination. 29 % des EC HLA-B*57+ et 21 % des EC HLA-B*57- ont démontré des capacités de neutralisation à large spectre (au moins 40 % des souches virales testées).

De manière remarquable, des études de corrélation réalisées par notre équipe ont montré que la fréquence des lymphocytes B mémoires spécifiques du VIH était corrélée positivement avec la puissance de neutralisation chez les EC HLA-B*57+ (et non chez les EC HLA-B*57-), ce qui suggère que la préservation des lymphocytes B mémoires spécifiques du VIH pourrait contribuer aux réponses neutralisantes chez ce sous-groupe de patients.



Research Paper

HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection



Angeline Rouers ^{a,1}, Jéromine Klingler ^{b,1}, Bin Su ^{b,c}, Assia Samri ^d, G  r  ldine Laumond ^b, Sophie Even ^d, Véronique Avettand-Fenoel ^{e,f}, Clemence Richetta ^a, Nicodème Paul ^b, Faroudy Boufassa ^g, Laurent Hocqueloux ^h, Hugo Mouquet ^{i,j}, Christine Rouzioux ^{e,f}, Olivier Lambotte ^{k,l,m,n}, Brigitte Autran ^{d,o}, Stéphanie Graff-Dubois ^a, Christiane Moog ^{b,**}, Arnaud Moris ^{a,*}, for the ANRS CO21 Cohort

^a Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, France

^b INSERM UMR_S 1109, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Center for Infectious Diseases, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

^d Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, Center for Immunology and Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, France

^e EA7327, Univ Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Faculté de Médecine, Paris, France

^f APHP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Laboratoire de Virologie, Paris, France

^g INSERM, U1018, Faculté de Médecine Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

^h Service des Maladies Infectieuses Tropicales, Centre Hospitalier Régional, Orléans, France

ⁱ Laboratory of Humoral Response to Pathogens, Department of Immunology, Institut Pasteur, Paris, France

^j INSERM, U1222, Paris, France

^k Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

^l INSERM UMR-1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases, Le Kremlin Bicêtre, France

^m CEA, DSV/IMETI, Division of Immuno-Virology, IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France

ⁿ AP-HP, Service de Médecine Interne-Immunologie Clinique, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

^o AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Department of Immunology, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2017

Received in revised form 17 May 2017

Accepted 22 May 2017

Available online 31 May 2017

Keywords:

HIV

Elite controllers

Memory B cells

B cell-ELISPOT

Neutralization

Tier-2 virus

IgG

ABSTRACT

HIV-specific broadly neutralizing antibodies (bnAbs) have been isolated from patients with high viremia but also from HIV controllers that repress HIV-1 replication. In these elite controllers (ECs), multiple parameters contribute to viral suppression, including genetic factors and immune responses. Defining the immune correlates associated with the generation of bnAbs may help in designing efficient immunotherapies. In this study, in ECs either positive or negative for the HLA-B*57 protective allele, in treated HIV-infected and HIV-negative individuals, we characterized memory B cell compartments and HIV-specific memory B cells responses using flow cytometry and ELISPOT. ECs preserved their memory B cell compartments and in contrast to treated patients, maintained detectable HIV-specific memory B cell responses. All ECs presented IgG1 + HIV-specific memory B cells but some individuals also preserved IgG2 + or IgG3 + responses. Importantly, we also analyzed the capacity of sera from ECs to neutralize a panel of HIV strains including transmitted/founder virus. 29% and 21% of HLA-B*57 + and HLA-B*57 – ECs, respectively, neutralized at least 40% of the viral strains tested. Remarkably, in HLA-B*57 + ECs the frequency of HIV-Env-specific memory B cells correlated positively with the neutralization breadth suggesting that preservation of HIV-specific memory B cells might contribute to the neutralizing responses in these patients.

   2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; Env, HIV envelope protein; cART, combined antiretroviral therapy; EC, elite controller; IgG, immunoglobulin G; (n)Ab, (neutralizing) antibody; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CTL, cytotoxic T cell; T/F, transmitted/founder virus; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; ASC, antibody secreting cell; AM, activated memory B cells; RM, resting memory B cells; IM, intermediate memory B cells; MZ-like B cells, marginal zone-like B cells; TLM B cells, tissue like memory B cells.

* Correspondence to: Arnaud Moris, Center for Immunology and Microbial Infections, CIMI-Paris, 91 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

** Correspondence to: Christiane Moog, INSERM UMR_S 1109, centre de Recherche en Immunologie et H  matologie, Faculté de Médecine, 67000 Strasbourg, France.

E-mail addresses: c.moog@unistra.fr (C. Moog), arnaud.moris@upmc.fr (A. Moris).

¹ A.R. and J. K. contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.029>

2352-3964/   2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

HIV-1 (HIV) infection alters B cell differentiation resulting in spontaneous immunoglobulin secretion, hypergammaglobulinemia (Lane et al., 1983) and decrease in memory B cell frequencies (Moir et al., 2008; Hu et al., 2015; Buckner et al., 2013). HIV-specific antibodies (Abs), with the capacity to neutralize the autologous virus, appear several months after infection. However, these Abs poorly neutralize heterologous HIV strains (Tomaras et al., 2008; Moog et al., 1997; Wei et al., 2003; Deeks et al., 2006; Richman et al., 2003; Gray et al., 2007). Cross-reactive neutralizing Abs, are produced only 2 to 4 years after seroconversion (Gray et al., 2011; Mikell et al., 2011; Richman et al., 2003) and at low titers in most individuals (Hraber et al., 2014). Only 20% of patients harbor high titers of cross-reactive neutralizing Abs (Doria-Rose et al., 2010). Among them, 1% were identified as elite neutralizers based on the capacity of their plasma to neutralize, across clades, a large panel of HIV strains (Li et al., 2007; Simek et al., 2009). Broadly neutralizing monoclonal Abs (bnAbs) were cloned from HIV-specific memory B cells isolated from these patients (Scheid et al., 2009; Mouquet, 2014; Sok and Burton, 2016). Understanding how these bnAbs are generated in HIV-infected individuals could lead the path to the development of an antibody-based vaccine. In viremic patients, the breadth of neutralization has been associated with higher viral loads (Doria-Rose et al., 2010; Piantadosi et al., 2009; Deeks et al., 2006; Sajadi et al., 2011; Doria-Rose et al., 2009; Sather et al., 2009; Rodriguez et al., 2007), duration of viral exposure and viral diversity (Rusert et al., 2016).

HIV-infected individuals who naturally control HIV infection without combined antiretroviral therapy (cART) (Saez-Cirion and Pancino, 2013), in particular elite controllers (ECs, <1% of HIV-infected individuals) who maintain very low to undetectable viremia (Lambotte and Delfraissy, 2005; Grabar et al., 2009) represent a unique chance to study immune responses potentially involved in viral suppression (Walker and Yu, 2013). A fraction of ECs exhibit potent cytotoxic CD8 + T cell responses against HIV-infected cells (Saez-Cirion et al., 2007; Betts et al., 2006; Hersperger et al., 2011), often associated with the expression of the HLA-B*57 allele (Migueles et al., 2000; Lambotte and Delfraissy, 2005; Betts et al., 2006). HIV-specific CD4 + T cells of ECs express high avidity T cell receptors (TCRs) suggesting that T cell helper responses contribute to HIV-control (Benati et al., 2016). In contrast, several studies have shown that ECs present lower cross-neutralizing Ab responses as compared to viremic individuals (Lambotte et al., 2009; Pereyra et al., 2008; Bailey et al., 2006; Sajadi et al., 2011). However, among ECs, there is a marked heterogeneity, some presenting broad cross-neutralizing capacities while others show minimal or no neutralization (Lambotte et al., 2009; Scheid et al., 2009; Pereyra et al., 2008; Bailey et al., 2006; Sajadi et al., 2011). Non-neutralizing Ab responses might also exert significant antiviral activities (Chung et al., 2015). In particular, titers of Abs executing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) have been shown to be higher in ECs (Lambotte et al., 2009) and predominant in HLA-B*57 – ECs as compared to HLA-B57 + ECs (Lambotte et al., 2013). More recently, HIV-control has been linked to the capacity of the sera from ECs to perform multiple effector functions (Ackerman et al., 2016). Indeed, depending on their isotype, Abs exhibit different effector functions such as Fcγ receptors (FcγR) binding, initiation of ADCC and activation of the complement cascades. Although the immunoglobulin G1 (IgG1) subclass dominates HIV-specific responses, the proportion of IgG isotypes might vary depending on individuals, the HLA status and the clinical parameters (Binley et al., 2008; Banerjee et al., 2010; Ackerman et al., 2016; French et al., 2013). Ackerman et al. showed that the sera from ECs exhibiting strong polyfunctional antiviral activities are enriched in Abs of IgG1 and IgG3 subclasses (Ackerman et al., 2016). IgG2 Abs to the HIV Gag protein have been associated with long-term nonprogression (Martinez et al., 2005; Ngo-Giang-Huong et al., 2001) and seem more abundant in HLA-B*57 – ECs compared to HLA-B*57 + ECs (French et al., 2013). Therefore, the quality of Ab responses, defined by the

diversity of Ab subclasses should be considered when characterizing Ab responses elicited by HIV infection and vaccine candidates.

A successful vaccine should lead to the generation of long-lived plasma cells and memory B cells that are thought to be essential for sustained humoral immunity. However, during chronic infection, the persistence of viral antigens alters B cell differentiation into memory cells (Colineau et al., 2015). Memory B cells can be divided in 4 subpopulations: activated memory (AM, CD27 + CD21 –), resting memory (RM, CD27 + CD21 +), intermediate memory (IM, CD27 – CD21 +) and tissue-like memory B cells (TLM, CD27 – CD21 –) (Moir et al., 2008). AM and TLM B cells (the latter corresponding to anergic cells) are overrepresented in untreated HIV-infected patients (Moir et al., 2008; Pensiero et al., 2013) and are associated with higher levels of viremia (Kardava et al., 2014). In contrast, RM cells that contribute to maintaining humoral responses, are decreased upon infection (Good et al., 2009; Moir and Fauci, 2013). Remarkably, HIV-specific B cells are enriched in TLM and AM B cell subsets but decreased in RM cells (Kardava et al., 2014). Compared to the levels in HIV-negative individuals, cART restores TLM and AM B cell proportions and only partially the RM compartment (Moir et al., 2008; Moir et al., 2010; Pensiero et al., 2013). Although ECs do not clear the infection, studying their memory B cell responses could help understand the maintenance of long lasting humoral immunity in the presence of low to undetectable antigen loads. In ECs, RM and AM B cell proportions are higher compared to treated HIV-infected patients but no differences were observed concerning the percentage of TLM cells (Pensiero et al., 2013). However, in ECs, the frequency of HIV-specific TLM B cells is reduced compared to treated HIV-infected patients (Buckner et al., 2016). Taken together, these results suggest that ECs preserve their memory B cell compartments but also exhibit features of viremic individuals (increased AM cells). Whether this preservation of the memory B cell subsets, in ECs, is associated with the maintenance and/or a higher frequency of HIV-specific memory B cells expressing various Ab subclasses remains an open question. In addition, potential correlations between HIV-specific memory B cell frequencies and the neutralization breadth in sera have not been investigated so far. Two studies previously analyzed potential correlations between Ab responses and Ab secreting cells (Bussmann et al., 2010; Doria-Rose et al., 2009). Bussman et al. asked whether the frequency of Env/gp120-specific B cells might correlate with the Ab titers to Env/gp120 protein (Bussmann et al., 2010) while Doria-Rose et al. studied the frequency of plasmablasts that spontaneously secrete HIV-specific Abs and the breadth of neutralization (Doria-Rose et al., 2009). Both studies failed to observe any correlation between these HIV-specific B cell responses and the Ab profiles.

In the present study, we characterized memory B cell responses in a cohort of ECs either positive or negative for the HLA-B*57 protective allele. We analyzed whether the preservation of B cell compartments might be linked to the capacity of B cells to secrete HIV-specific Abs. We compared B cell responses in HLA-B*57 + and HLA-B*57 – ECs with either that of aviremic patients undergoing successful cART or HIV-negative individuals. We observed a global preservation of memory B cell compartments in ECs with a proportion of TLM comparable to what was observed in cART and HIV-negative individuals. Interestingly, HIV-specific B cells were detected in 82% of ECs. In contrast, only 7% of cART patients presented HIV-specific responses whereas all groups exhibited similar levels of Influenza-specific B cell responses. HIV-specific responses consisted mainly of IgG1 secreting B cells although HIV-specific IgG2 and IgG3 secreting B cells were detected in a third of ECs. Next we analyzed whether these B cell responses might correlate with the capacity of patients' sera to neutralize HIV. For this purpose, we used mostly difficult-to-neutralize tier-2 transmitted/founder (T/F) viruses. 89% of sera from ECs neutralized at least one HIV strain tested and 8% blocked infection of at least 40% of difficult-to-neutralize tier-2 T/F viruses. Remarkably, among HLA-B*57 + ECs, the frequency of Env-specific memory B cells correlated positively with the capacity to neutralize T/F HIV strains, suggesting that these cells might contribute

to the neutralizing responses in this group of ECs. Overall, through the analysis of Env-specific memory B cell frequencies, the isotype diversity and the neutralization breadth, our results reveal major differences between HLA-B*57+ and HLA-B*57– ECs.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Samples

EC (n = 37) were recruited from the CO21 CODEX cohort implemented by the ANRS (Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales). Whole blood and PBMC were cryopreserved at enrolment. Ten million PBMCs from ECs were available for this study. ECs

were defined as HIV-infected individuals maintaining viral loads (VL) under 400 copies of HIV RNA/mL without cART for >5 years. ECs were divided in 2 groups: HLA-B*57+ (n = 18) or HLA-B*57– (n = 19). HIV-infected efficiently treated patients (cART) (n = 13) were recruited at Kremlin Bicêtre Hospital. They were treated for at least 1 year (mean of 10 years) and had an undetectable viral load using standard assays. HIV-negative individuals (n = 12) were anonymous blood donors (Établissement Français du sang). A detailed description of the patients is provided in Table 1, including the median and interquartile range for age (at the time of the study), CD4 T cell count and RNA load for each group. HIV-RNA loads were measured on site with different real-time PCR-based assays; depending on the date of enrolment in the cohort and the assay routinely used on each site, the VL detection limit varied

Table 1
Clinical and epidemiological characteristics of the study groups.

	#	Sex	Age	Infection (Years)	HLA-R(1)	HLA-R(2)	VL RNA (copies/mL)	us VL RNA (copies/mL)	Proiral DNA (copies/10 ⁶ PBMC)	CD4 count (cells/mm ³)	Nadir CD4 (cells/mm ³)	cART (years)	Treatment	Color code
Elite Controllers (EC)														
EC Median (IQR)			49 (33–63)	16 (6–29)					15 (2–351)	825 (279–1400)				
B*57+			50 (40–63)	20 (8–29)					7 (4–351)	862 (279–1400)				
HLA-B*57+	1	F	41	11	18	57	43	43	4	702	-	NO	-	
	2	M	48	8	53	57	<40	3	351	801	-	NO	-	
	3	F	56	18	44	57	<10	<1	4	1400	-	NO	-	
	4	F	63	10	52	57	<10	<1	15	630	-	NO	-	
	5	F	57	17	57	NA	20	NA	7	999	-	NO	-	
	6	F	55	26	18	57	<20	<1	4	770	-	NO	-	
	7	M	51	26	51	57	42	17	24	824	-	NO	-	
	8	F	44	25	57	70(71)	240	NA	33	826	-	NO	-	
	9	M	50	26	44	57	<20	<13	NA	1201	-	NO	-	
	11	M	63	27	7	57	60	135	213	1022	-	NO	-	
	12	F	49	29	8	57	<40	<1	4	512	-	NO	-	
	13	M	51	24	7	57	47	NA	4	1020	-	NO	-	
	14	F	43	10	53	57	166	NA	27	862	-	NO	-	
	15	M	44	9	27	57	23	NA	4	979	-	NO	-	
	16	F	40	20	57	NA	<20	<1	16	880	-	NO	-	
	17	M	62	27	7	57	<40	NA	NA	1074	-	NO	-	
	18	F	48	19	14(65)	57	<20	<1	4	279	-	NO	-	
	19	F	52	24	57(63)	15(63)	<40			1153	-	NO	-	
B*57–			48 (33–59)	13 (6–27)					23 (2–159)	723 (432–1311)				
HLA-B*57–	20	F	34	13	40(60)	15(62)	<40	NA	3	1078	-	NO	-	
	21	F	53	6	35	52	<40	<1	4	694	-	NO	-	
	22	F	40	6	18	NA	<10	2	83	1130	-	NO	-	
	23	F	37	12	8	76	168	NA	159	529	-	NO	-	
	24	F	36	6	72	153	NA	10	432	-	NO	-	-	
	25	F	48	24	27(81)	71	61	NA	46	823	-	NO	-	
	26	M	40	23	27	45	<40	1	13	585	-	NO	-	
	27	F	57	26	27	51	<40	<1	43	1060	-	NO	-	
	28	F	49	8	44	NA	<20	<1	126	853	-	NO	-	
	29	M	59	11	40(60)	15(62)	71	NA	26	519	-	NO	-	
	30	F	50	13	44	45	50	NA	19	723	-	NO	-	
	31	M	50	21	39	41	103	NA	109	504	-	NO	-	
	32	F	50	26	51	41	<20	<1	4	1311	-	NO	-	
	33	F	37	14	44	82	62	NA	3	500	-	NO	-	
	34	M	33	7	49	50	413	NA	42	600	-	NO	-	
	35	M	38	7	18	44	90	NA	127	1122	-	NO	-	
	36	M	52	10	35	40(60)	<50	1	2	1234	-	NO	-	
	37	M	50	16	13	14	32	NA	3	1085	-	NO	-	
	38	M	48	27	27	51	<20	22	23	561	-	NO	-	
Aviremic treated HIV-infected patients (cART)														
cART Median (IQR)			50 (31–66)	16 (2–30)						570 (288–787)	219 (24–592)	12 (1–17)		
42	M	66	25	NA	NA	undetect.		NA	561	50	YES	15	Isentress+Norvir+Prezista	
43	F	58	27	NA	NA	undetect.		NA	448	24	YES	17	Kivexa+Viramune	
44	F	31	2	NA	NA	undetect.		NA	570	369	YES	2	Kivexa+Norvir+Reyataz	
45	M	54	17	NA	NA	undetect.		NA	787	251	YES	16	Invitress+Kaletra	
46	M	50	16	NA	NA	undetect.		NA	572	222	YES	16	Isentress+Truvada	
47	M	58	9	NA	NA	undetect.		NA	580	342	YES	1	Isentress+Kivexa	
48	M	42	30	NA	NA	undetect.		NA	415	173	YES	9	Isentress+Truvada	
49	F	35	4	NA	NA	undetect.		NA	288	149	YES	4	Atripla	
50	M	49	21	NA	NA	undetect.		NA	609	219	YES	12	Kivexa+Viramune	
51	M	51	14	NA	NA	undetect.		NA	330	193	YES	13	Atripla	
52	M	57	27	NA	NA	undetect.		1740	335	172	YES	17	Kivexa+Viramune	
53	F	42	13	NA	NA	undetect.		NA	587	537	YES	5	Atripla	
54	M	46	10	7	56	undetect.		290	765	592	YES	10	Truvada+Reyataz	

^a NA, data not available; M, male; F, female; VL, viral load; us VL, ultra sensitive VL; (-) not applicable.

from 50 to 10 copies/mL. To better quantify low levels of viral replication, VL were also determined using an ultrasensitive, real-time PCR technique (GENERIC HIV, Biocentric, Bandol, France) with a threshold ranging from 1 to 13 copies/mL, depending on the available plasma volume. Total cells associated HIV-1 DNA levels were quantified using the real time PCR GENERIC HIV-DNA assay (Biocentric, Bandol, France) (Avettand-Fenoel et al., 2009).

2.2. Ethic Statement

All the subjects provided their written informed consent to participate in the study. The CO21 CODEX cohort and this sub-study were funded and sponsored by ANRS and approved by the Ile de France VII Ethics Committee. The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

2.3. Flow Cytometry

Cell viability was evaluated using LIVE/DEAD® (ThermoFisher Scientific) and the following Abs were used: CD19-APCCy7 (SJ25C1), CD21-APC (B-ly4), CD27-PE (M-T271), IgD-PECF594 (IA6-2), IgG-BV605 (G18-145), CD38-V450 (HB7) (all from BD biosciences), IgM-AF700 (CH2, Exbio) and IgG2-AF488 (HP6002, Southern Biotech). Staining assays were performed using standard procedures in PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA (20 min at 4 °C). Samples were processed on a Fortessa cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences) and further analyzed using FlowJo2 software (Tree Star).

2.4. Differentiation of B cells into Antibody Secreting Cells

PBMCs were thawed and cultured in Yssel medium supplemented with 1% human AB serum (Institut Jacques Boy), 0.5 µg/mL of TLR7/8 ligand (R848, InVivoGen) and 100 U/mL rhIL-2 (Miltenyi Biotec). Cells were cultured at 1×10^6 cells/mL. After 6 days, cells were harvested, the proportion of B cells evaluated using flow cytometry (using anti-CD19 antibody, not shown) and the frequency of HIV-specific B cells evaluated using B cell-ELISPOT assay (Pinna et al., 2009).

2.5. B Cell-ELISPOT Assay

ELISPOT plates (Millipore MSIPN4550) were pre-wet with 35% ethanol (1 min), washed with PBS and coated overnight at 4 °C with 15 µg/mL anti-IgG antibodies (Mabtech, MT91/145) or viral antigens diluted in PBS. HIV antigens included a trimeric cleavage-deficient recombinant glycoprotein from the YU-2 clade B (tier-2) HIV viral strain (gp140YU2b, originally described in (Yang et al., 2000)) produced in HEK293T-derived cells by transient transfection as previously described (Lorin and Mouquet, 2015), gp41S30 (Licence N°WO2012101509 A2) and gp160THO (92THO23), oligomeric envelope glycoprotein produced from a hybrid HIV env gp120 from CRF01_AE (92THO23) and subtype B (LAI) gp41, which is deleted in the principal immunodominant domain (PID), expressed by vaccinia virus in BHK21 cells (Thongcharoen et al., 2007). HIV antigens were coated at 10 µg/mL. Influenza antigens (5 µg/mL, 2015 VAXIGRIP vaccine, Sanofi Pasteur Msd) and keyhole limpet hemocyanin (KLH, 10 µg/mL, Sigma-Aldrich) were used as positive and negative controls, respectively. Plates were washed with PBS and saturated with RPMI containing 10% FBS. Six days post activation, 1500 to 3000 or 1.5×10^5 to 3×10^5 B cells/well were plated for total IgG or antigen-specific detections, respectively, and incubated overnight at 37 °C in RPMI + 10% FBS. Plates were then washed with PBS + 0.05% Tween-20 prior incubation with biotinylated anti-IgG (1 µg/mL, MT78/145, Mabtech), anti-IgG1 (1 µg/mL, G17-1, BD), anti-IgG2 (0.2 µg/mL, HP6200, Mabtech) or anti-IgG3 (0.2 µg/mL, HP6050, Southern Biotech) Abs (2 h, RT). Elispots were revealed using alkaline-phosphatase coupled streptavidin (0.5 U/mL, Roche Diagnostics, 1 h RT) and 50 µl BCIP/NBT substrate (15 min, Sigma). The reaction was stopped using

water. The number of spots was counted using AID reader (Autoimmun Diagnostika GmbH). For each experimental condition, the Elispot was performed mostly in triplicates and at least in duplicates. Frequency of antigen-specific B cells was calculated taking account the number of CD19 + B cells plated.

2.6. HIV-Specific IgG Ab Detection by Elisa

96-well plates were coated overnight with a sheep anti-human IgG (1 µg/mL in carbonate buffer, Binding Site) for the detection of total IgGs, or with gp140YU2b or gp41S30 (2 µg/mL in carbonate buffer) for the detection of anti-gp140 or anti-gp41 IgGs, respectively. Plates were washed and saturated with PBS containing 5% BSA and incubated with diluted sera (2 h, at 37 °C). Plates were then washed and a secondary goat anti-human IgG-HRP (HorseRadish Peroxidase) added (1 h at 37 °C, 0.2 µg/mL in PBS, Southern Biotech). Finally, TMB (3,3', 5,5'-TetraMethylBenzidine) substrate was added. After 30 min, the reaction was stopped (using 25 µL of 1 M H₂SO₄ per well) and the optical density (OD) read at 450 nm (reference 650 nm). The ratios of HIV-specific IgG were calculated as (OD of anti-gp140 or anti-gp41 IgGs × serum dilution) / (OD of total IgG × serum dilution).

2.7. Viruses and TZM-bl Neutralization Assays

For neutralization, pseudoviruses were produced by cotransfecting 293T cells with HIV-1 env expression plasmid SF162.LS, QH0692.42 and YU2 and the env-deficient HIV-1 backbone plasmid (pSG3ΔEnv). Infectious molecular clones: CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18, REJO 4541.67 and TRJO4551.58 were produced by transfection on 293T cells. These different strains were obtained through the NIH AIDS reagent program.

Sera were tested for their ability to neutralize HIV-1 using TZM-bl neutralization as described previously (Li et al., 2005). As negative controls, HIV-negative sera (purchased at Etablissement Français du Sang) were used and the capacity of ECs sera to neutralize MuLV was assessed. One tier-1 reference strains (SF162.LS), eight tier-2 strains (YU2, QH0692.42, CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18 and REJO4541.67) and one tier-3 strain (TRJO4551.58) were used. CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18 and REJO4541.67 and TRJO4551.58 are T/F viruses. The 50% inhibitory reciprocal dilution (IRD50) was defined as the sample reciprocal dilution that caused a 50% reduction in relative luminescence units (RLU) (Li et al., 2005).

2.8. Statistics

Statistical significances (p-values) were determined using a Kruskal-Wallis test or a Mann-Whitney test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) and associations between continuous variables were evaluated using Spearman rank order correlation test using Prism software (GraphPad) and "Visualization of a Correlation Matrix" R package version 0.77 (<https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>).

3. Results

We characterized memory B cell responses and HIV cross-neutralization potential in a cohort of ECs either positive or negative for the HLA-B*57 protective allele. We compared HLA-B*57+ and HLA-B*57- ECs with aviremic patients undergoing successful cART or HIV-negative individuals (Table 1).

3.1. Memory B Cell Compartments are Preserved in EC

Using flow cytometry, we first analyzed the peripheral memory B cell compartments (as shown in Supplemental Fig. 1). The proportion of CD19 + B cells was slightly higher, although not significantly, in ECs compared to HIV-negative donors (Fig. 1a). ECs, cART and HIV-negative

donors presented no significant differences concerning the proportions of AM, IM and RM B cells (Fig. 1b) or other populations studied (total memory B cells, naïve B cells, IgG+ and IgG2+ memory B cells, plasmablasts and Marginal Zone-like (MZ-like) B cells (Supplemental Fig. 2). In contrast, a significant increase of TLM B cell proportion was detected in HLA-B*57   ECs compared to HIV-negative individuals (Fig. 1b, $p = 0.0247$). Overall, with the exception of the TLM B cells that were slightly expanded in HLA-B57   ECs, the B cell compartments seemed preserved in ECs.

3.2. EC Maintain HIV-Specific Memory B Cell Responses with Stronger Proliferative Capacity

We then evaluated the frequency of HIV-specific memory B cells using ELISPOT (Fig. 2 and Supplemental Fig. 3). The frequencies of B cells secreting total IgG, IgG1 or IgG3 were not significantly different between the 3 groups (Supplemental Fig. 3). In contrast, we noticed a reduced frequency of IgG2 secreting B cells in ECs compared to HIV-negative donors ($p = 0.0131$, Supplemental Fig. 3c). To detect antigen-specific B cell responses, we used different HIV envelopes (HIV Env): gp140Yu2b, gp41S30, gp160THO and Influenza antigens or KLH as positive and negative controls, respectively. The gp140Yu2b trimers can capture the B-cells and bind to non-neutralizing and cross-neutralizing Abs (Scheid et al., 2009; Mouquet et al., 2011) of all specificities and more importantly, of all types of bNAbs and clonal variants (Scheid et al., 2011; Mouquet et al., 2012), except PG16-like Abs. Gp41S30 is the target of Abs to gp41 such as bNAbs against the MPER (e.g. 2F5, 4E10 and 10E8) or non-NABs against the PID (e.g. 7B2). Gp160THO was used in the RV144 vaccine trial that showed an estimated 31% vaccine efficacy (Rerks-Ngarm et al., 2009). It allows the capture

of Abs directed to gp120 and to gp41 except Abs directed to the PID and PG16-like Abs. As an additional control, the frequency of HIV-specific B cells was evaluated in healthy HIV-negative donors (Fig. 2a). Remarkably, 82% of ECs (27/33 ECs tested) but only 7% of cART patients (1/13) exhibited a positive response against HIV Envs (Fig. 2a). This very low frequency of responders among cART patients was consistent with other studies describing that upon initiation of cART the frequency of HIV-specific B cells drops to low or undetectable levels (Morris et al., 1998; Busmann et al., 2010; Buckner et al., 2016). This difference is strictly specific to HIV antigens since both groups reacted to Influenza antigens (63% and 75% reacting ECs and cART-patients, respectively) (Fig. 2b). Therefore, although both ECs and cART patients have undetectable viral loads, Env-specific memory B cells were detected mainly in ECs.

3.3. HIV-Specific Memory B Cell Responses are Mainly of the IgG1 Isotype

We next analyzed the specificity and isotype of HIV-specific secreted Abs in ECs (Fig. 3). Patients with detectable antibody responses to gp140 also reacted against gp41 and gp160 (Fig. 3A). In ECs, IgG+ B cells specific for gp140, gp41 and gp160 represented respectively 0.24, 0.20 and 0.13 mean % of IgG+ B cells (Fig. 3A). In ECs, the frequencies of IgG+ Influenza-specific and HIV Env-specific B cells were in the same order of magnitude (Fig. 3a). Note that in ECs, cART and HIV-negative donors, we did not observe a significant difference in the frequency of Influenza-specific B cells (Supplemental Fig. 4).

HIV Env- and Flu-specific B cell responses in ECs were mainly mediated by IgG1 Abs, which represented nearly 50% of responses (Fig. 3b). In addition, all patients reacting to HIV Env antigens exhibited an HIV-specific IgG1 response. In contrast, only 35% and 26% of ECs showed

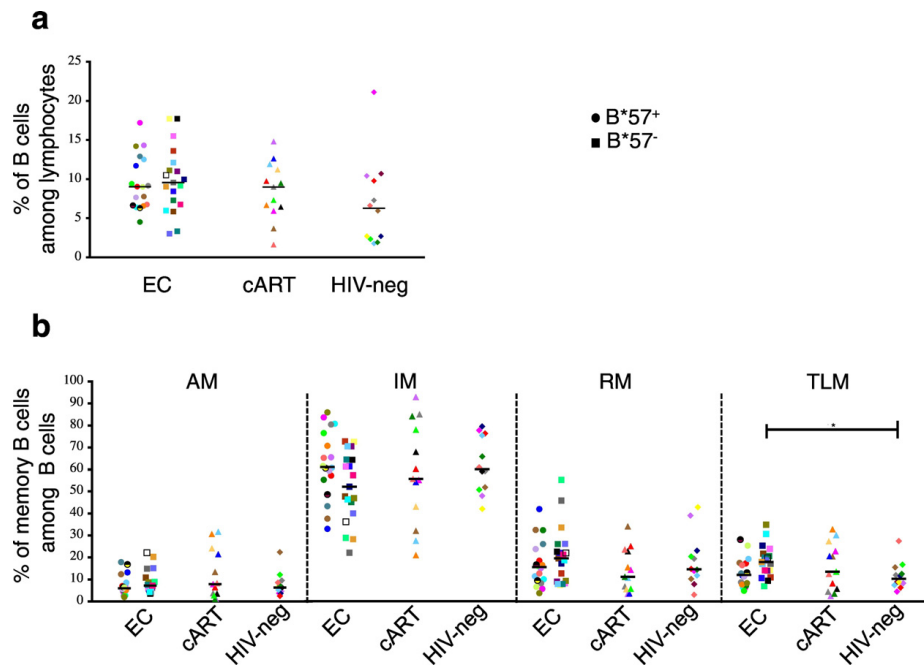


Fig. 1. Memory B cell compartments are preserved in ECs. In PBMC from ECs ($n = 37$), cART ($n = 13$) and HIV-negative donors ($n = 12$): (a) frequency of CD19+ B cells among lymphocytes and (b) frequencies of AM (CD27+CD21  ), IM (CD27  CD21+), RM (CD27  CD21+), and TLM (CD27  CD21  ) B cells among CD19+ B cells. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Circle: HLA-B*57+ EC; Square: HLA-B*57   ECs. The statistical significance was calculated using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test ($p < 0.05$). Bars indicate median values.

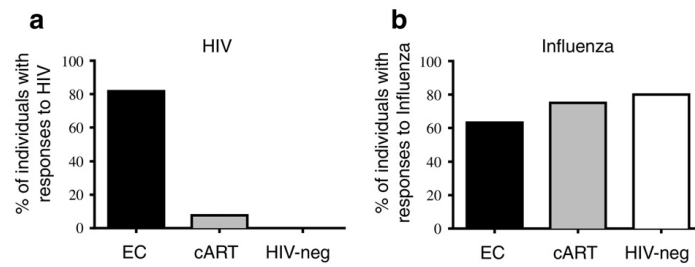


Fig. 2. ECs maintain HIV-specific memory B cell responses. Percentage of ECs ($n = 33$), cART ($n = 13$) and HIV-negative ($n = 6$) donors presenting memory B cell responses against (a) at least one HIV antigen (gp140_{YU2B}, gp41_{S30} or gp160_{THO}) and (b) Influenza vaccine antigens (2015 VAXIGRIP vaccine). B cell memory responses were evaluated by B cell ELISPOT.

gp140-specific IgG2 + or IgG3 + B cell responses, respectively (Fig. 3c–d). Note that IgG2 + and IgG3 + responses were not necessarily detected in the same patients (Fig. 3c–d).

Finally, whatever the targeted antigens, the proportion of ECs presenting IgG, IgG1, IgG2 and IgG3 Env-specific memory B cell responses and the magnitude of these responses were similar in HLA-B*57 – and HLA-B*57 + ECs (Fig. 3).

3.4. In HLA-B*57 + ECs, the Frequency of Env-Specific Memory B Cells Correlates with the Neutralization Breadth

We then asked whether HIV-specific B cell memory responses might be associated with the capacity of ECs to neutralize HIV-1 infection. To this end, we tested the ability of the sera from ECs to neutralize a reference (tier-1) strain, 8 difficult-to-neutralize tier-2 strains (including 7 transmitted founder (T/F) strains) and one highly difficult-to-neutralize tier-3 T/F strain (Fig. 4). Sera from most ECs (87%) neutralized the neutralization-sensitive HIV-1_{SF162} strain. 25% of sera neutralized at least 4 HIV strains out of the 10 tested (Fig. 4). 48% blocked infection of at least one tier-2 virus. 36% blocked at least one tier-2 T/F virus (Fig. 4b)

and 8% blocked at least 40% of tier-2 T/F strains (Fig. 4b). This demonstrates that some ECs effectively neutralize difficult-to-neutralize tier-2 T/F. Interestingly, when examining the neutralizing potential, the sera from HLA-B*57 + ECs had a twofold higher capacity to neutralize T/F strains than the sera from HLA-B*57 – ECs (Fig. 4a, average of 14% T/F neutralized versus 7% for HLA-B*57 + and HLA-B*57 – ECs, respectively), although this difference was not statistically significant ($p = 0.19$). In addition, 30% of the HLA-B*57 + versus 16% of the HLA-B*57 – ECs' sera neutralized >20% of the T/F viruses tested (Fig. 4b). This difference was almost exclusively due to the capacity of HLA-B*57 + ECs' sera to neutralize the T/F virus REJO.

To further analyze Ab responses in ECs, we examined potential correlations between the frequency of Env-specific B cells, evaluated in ELISPOT, and the percentage of neutralized strains for each individual (Fig. 5). In ECs, the capacity to neutralize all HIV strains or T/F viruses was neither associated with the frequency of anti-gp140 nor anti-gp41 secreting B cells (among IgG + B cells), for all IgG subclasses analyzed (Fig. 5a and not shown). However, by separating ECs into HLA-B*57 + and HLA-B*57 – donors, we showed that, among HLA-B*57 + ECs the frequency of gp140- and gp41-specific B cells correlated with

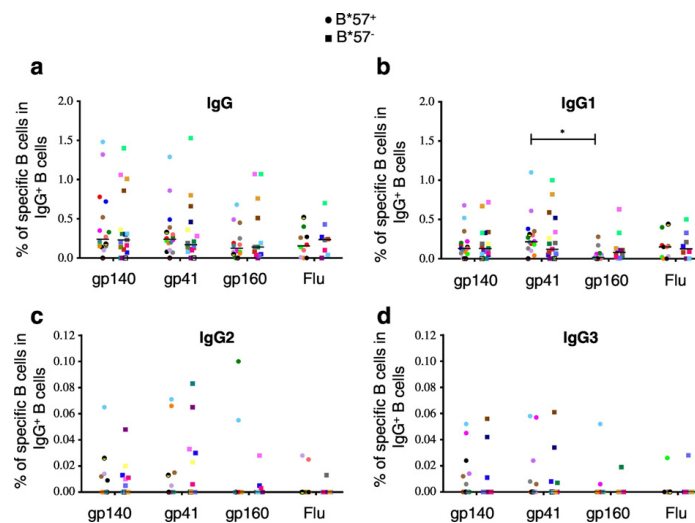


Fig. 3. In ECs, HIV-specific memory B cell responses are mainly of the IgG1 isotype. Percentage of antibody secreting B cells specific for HIV-Env antigens (gp140YU2B, gp41S30 or gp160THO) and Influenza vaccine antigen (Flu, 2015 VAXIGRIP vaccine) presented according to the Ab isotype: (a) total IgG +, (b) IgG1 +, (c) IgG2 + and (d) IgG3 + antigen-specific ASC. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Statistical significance was calculated using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test (* $p < 0.05$). Bars indicate median values.

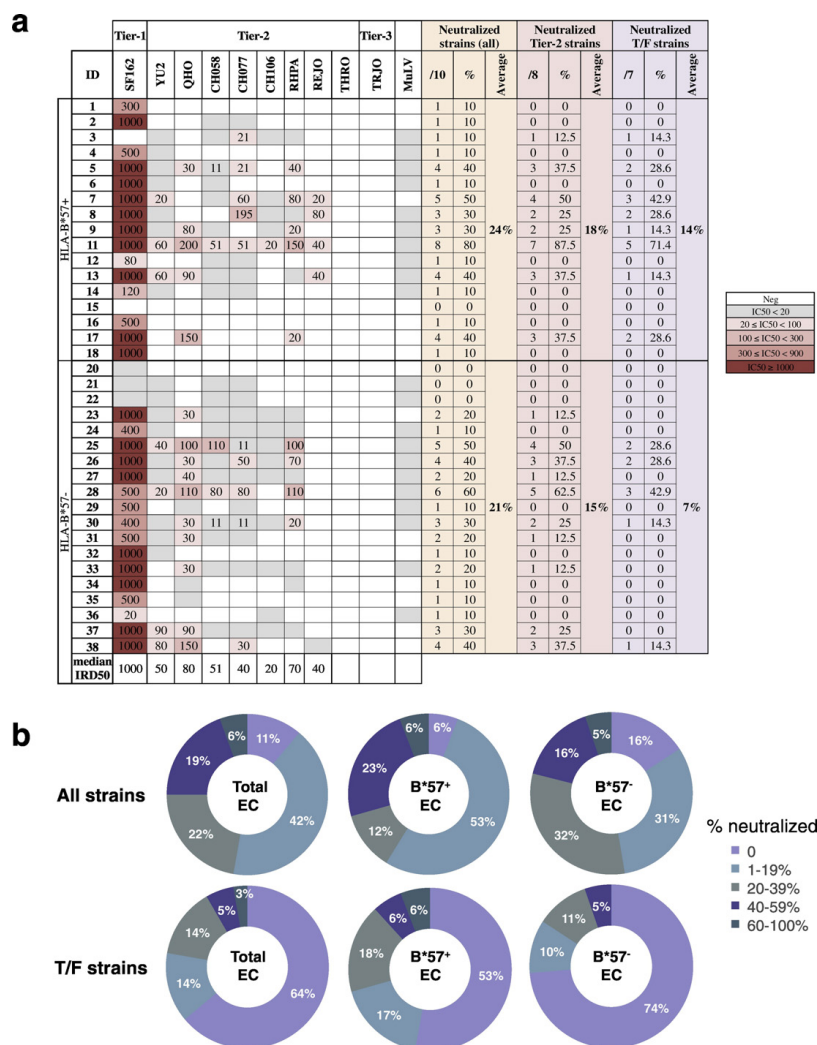


Fig. 4. Capacity of ECs to neutralize tier-2 T/F HIV strains in the TZM-bl assay. Sera from ECs ($n = 36$) were tested against one lab and 8 difficult-to-neutralize tier-2 HIV strains, including 7 T/F strains. The capacity to neutralize MuLV was used as a negative control. (A) Neutralization data are shown as the reciprocal serum dilution that neutralized 50% of the infection (IRD50) tested. A color code (right) indicates the potency of neutralization based on IRD50. The gray color indicates a decreased infection (at 1/20 dilution) that did not reach consistently 50% inhibition. An absence of color means that no neutralization was found at the lowest dilution tested (1/20). (B) Neutralization breadth expressed as percentage of neutralized strains for all strains (top panel) and T/F strains (lower panel) in all ECs (Total ECs, left rings), HLA-B*57+ (B*57+ ECs, middle rings) and HLA-B*57- ECs (B*57- ECs, right rings). The numbers indicate the % of patients for each fraction.

the capacity to neutralize all HIV strains ($p = 0.01$) including T/F viruses ($p = 0.02$) (Fig. 5a–b, blue square). Dissecting Env-specific isotypic responses in HLA-B*57+ ECs, we observed that gp41-specific IgG1 + B cell frequencies also correlated with the neutralization of all HIV strains ($p = 0.02$) and T/F strains ($p = 0.02$) (Fig. 5b, blue rectangle). In addition in these ECs, gp140-specific B cell frequencies correlated with the IRD50 for 6 out of 8 tier-2 T/F neutralized (Fig. 4a and not shown). Interestingly in HLA-B*57+ ECs, Env-specific IgG3 + memory B cell frequencies correlated positively with both total IgG and IgG1 Env-specific

responses without being directly associated to the neutralization potential (Fig. 5b).

In contrast, in HLA-B*57- ECs, the frequency of Env-specific B cells did not correlate positively with any of the neutralizing parameters analyzed. In fact in HLA-B*57- ECs, an inverse correlation was observed between the frequency of gp140-specific IgG B cells, or of gp140- and gp41-specific IgG1 B cells and the number of T/F viruses neutralized (Fig. 5b, red rectangles, $p < 0.05$). A significant inverse correlation was also observed between the frequencies of gp140- and gp41-specific

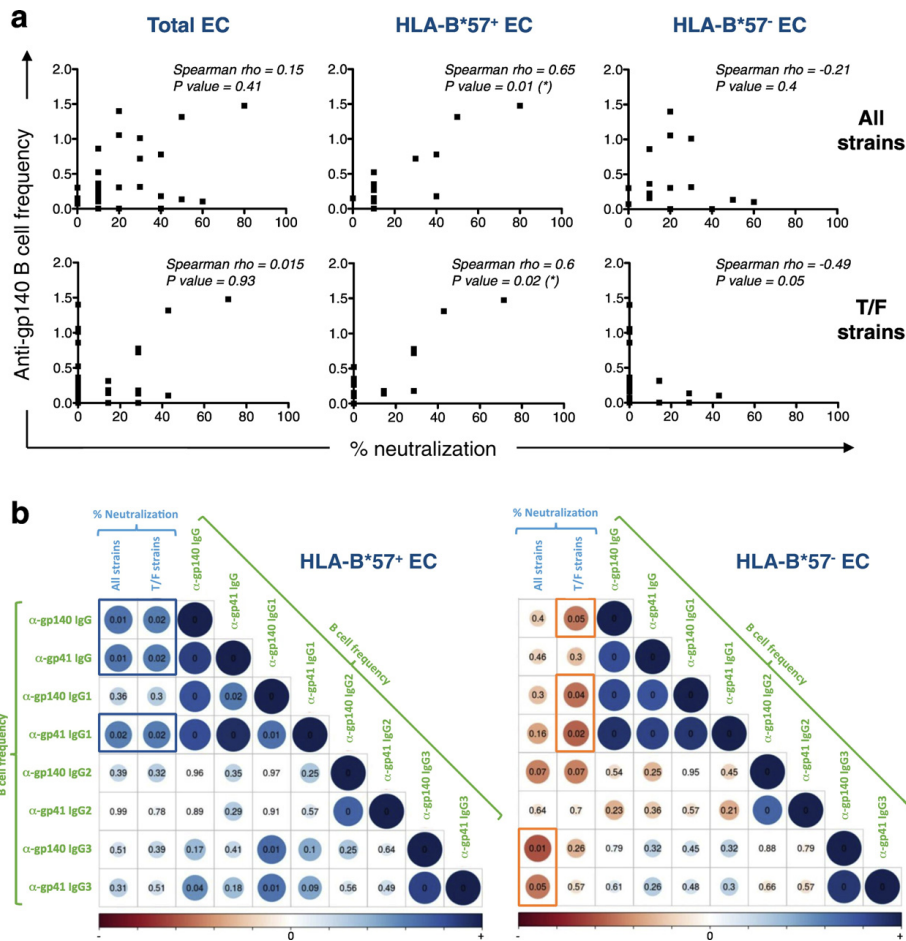


Fig. 5. In HLA-B*57 + ECs, the frequency of HIV-specific B cells correlates with the neutralization of tier-2 T/F virus. (a) Association of HIV gp140-specific B cell frequency (among IgG + B cells) and percent of neutralization for all HIV strains tested (top panel) or T/F HIV strains (bottom panel) for all ECs (Total EC), HLA-B*57 + and HLA-B*57 – ECs. (*) $p < 0.05$. (b) Spearman correlation matrices between the frequency of gp140- and gp41-specific B cell of various IgG isotypes and the percentage of neutralized strains (All strains) or T/F strains and the frequency of Env-specific B cell of various IgG subtypes. Left panel HLA-B*57 + and right panel HLA-B*57 – ECs. Strength and significance are represented as size and color intensity: blue for positive correlation and red for negative correlation. The numbers are p values.

IgG3 + B cells and the total number of viruses neutralized (Fig. 5b, red rectangle, $p < 0.05$). Note that these opposite correlations observed in HLA-B*57 + and HLA-B*57 – ECs, between Env-specific memory B cell frequencies and the neutralization potentials, did not mirror the quantity of Env-specific IgGs or IgG subclasses present in their sera (Supplemental Fig. 6 and not shown). Indeed, using Elisa, we detected similar levels of Env-specific IgGs in the sera of both groups (Supplemental Fig. 6a). In addition, no correlation was found between the frequency of Env-specific memory B cells and the quantity of Env-specific IgGs present in the sera (Supplemental Fig. 6b).

Altogether, these results show that HLA-B*57 + and HLA-B*57 – ECs have similar sustained frequency of HIV-specific B cells responses, similar HIV-specific Abs responses and non-statistically different neutralizing capacities. Despite these findings, the strong correlation observed in HLA-B*57 + ECs between the frequency of Env-specific memory B

cells and the neutralizing parameters suggests that the quality of the Env-specific Abs induced differ with that of HLA-B*57 – ECs. In HLA-B*57 + ECs, the maintenance of HIV-specific memory B cells may sustain the production of functionally relevant neutralizing Ab responses.

4. Discussion

In this study, we show that, in contrast to treated patients, ECs naturally preserve their memory B cell compartments and maintain HIV-specific memory B cell responses despite low to undetectable viral loads. HIV-specific B cells mainly express the IgG1 + Ab isotype and some ECs also express anti-HIV IgG2 and IgG3 Abs. The sera from a fraction of ECs exhibit a broad cross-neutralization capacity against difficult-to-neutralize tier-2 T/F viruses. Remarkably, the frequency of Env-specific B cells, in HLA-B*57 + ECs, correlates with a broader

Ackerman et al. proposed that the capacity to exert multiple antiviral functions might be linked to HIV-control (Ackerman et al., 2016). Indeed, depending on their isotype, Abs exert different antiviral functions. For instance, in contrast to IgG2 and IgG4, IgG1 and IgG3 bind strongly to FcR on phagocytic cells inducing efficient effector activity. Ackerman et al. showed that the sera from ECs exhibiting strong polyfunctional antiviral activities are enriched in Abs of IgG1 and IgG3 subtypes (Ackerman et al., 2016). In contrast, in viremic controllers, anti-HIV IgG2 production has been previously associated with HIV-control and slow progression (Martinez et al., 2005; Ngo-Giang-Huong et al., 2001). In this work, we show that in ECs, Env-specific memory B cell responses were mainly composed of IgG1 Abs. Only few ECs presented IgG2 + or IgG3 + responses. Interestingly in HLA-B*57 + ECs, Env-specific IgG3 + memory B cell frequencies correlated positively with both

total IgG and IgG1 Env-specific responses. In contrast, in HLA-B*57–ECs, Env-specific IgG3 + memory B cell frequencies were negatively associated with the neutralization breadth of HIV. These observations suggest that depending on the HLA genotype (e.g. HLA-B*57 +/–) different Ab isotypes and/or functions might be involved in immune control of HIV infection.

To summarize, our work highlights the facts that ECs maintain HIV-specific memory B cell responses associated to effective antiviral humoral activities and that Env-specific memory B cell responses are positively associated with the neutralization breadth in HLA-B*57 + ECs. We propose that promoting HIV-specific B cell polyfunctional responses by therapeutic vaccination might be highly beneficial in cART treated patients.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.029>.

Funding Sources

This work was granted by the ANRS (Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales). We thank the Dormeur Foundation, Vaduz, for providing AID ELISPOT Reader. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

Conceptualization: CR OL BA CM AM.
Funding acquisition: CR OL BA CM AM.
Investigation: AR JK BS SE CR AS GL VAF FB CR OL BA SGD CM AM.
Methodology: AR JK BS SE CR AS GL VAF FB LH HM CR OL BA SGD CM AM.
Project administration: FB CR OL BA SGD CM AM.
Resources: FB LH HM CR OL BA CM AM.
Software: AR JK NP CM AM.
Supervision: CM SGD AM.
Validation: CM AM.
Writing – original draft: AR AM.
Making of figures: AR JK CM AM.
Writing – review & editing: AR JK BS CR AS VAF FB LH HM CR OL BA SGF CM AM.

Acknowledgments

We thank Camille L  cureux and Francoise Churaqui for help and assistance. We thank all participants of the ANRS CODEX cohort. We thank Mia Rozenbaum for English editing.

References

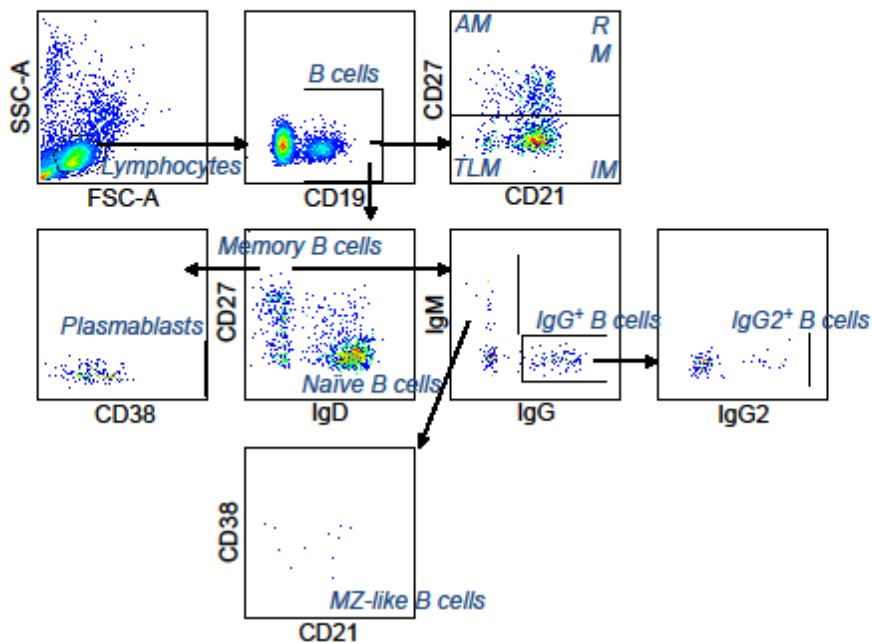
- Ackerman, M.E., Mikhailova, A., Brown, E.P., Dowell, K.G., Walker, B.D., Bailey-Kellogg, C., Suscovich, T.J., Alter, G., 2016. Polyfunctional HIV-specific antibody responses are associated with spontaneous HIV control. *PLoS Pathog.* 12, e1005315.
- Avettand-Fenoel, V., Chaix, M.L., Blanche, S., Burgard, M., Floch, C., Toure, K., Allemon, M.C., Warszawski, J., Rouzioux, C., French Pediatric Cohort Study, A.-C. O. G., 2009. ITR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J. Med. Virol.* 81, 217–223.
- Bailey, J.R., Lassen, K.G., Yang, H.C., Quinn, T.C., Ray, S.C., Blankson, J.N., Siliciano, R.F., 2006. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 80, 4758–4770.
- Banerjee, K., Klasse, P.J., Sanders, R.W., Pereyra, F., Michael, E., Lu, M., Walker, B.D., Moore, J.P., 2010. IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 26, 445–458.

- Barblu, L., Machmach, K., Gras, C., Delfraissy, J.F., Boufassa, F., LEAL, M., Ruiz-Mateos, E., Lambotte, O., Herbeval, J.P., Group, A. E. H. C. S., 2012. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon-alpha and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J. Infect. Dis.* 206, 790–801.
- Baum, L.L., Cassutt, K.J., Knigge, K., Khattri, R., Margolick, J., Rinaldo, C., Kleeberger, C.A., Nishanian, P., Henrard, D.R., Phair, J., 1996. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J. Immunol.* 157, 2168–2173.
- Benati, D., Galperin, M., Lambotte, O., Gras, S., Lim, A., Mukhopadhyay, M., Nouel, A., Campbell, K.A., Lemerrier, B., Claireaux, M., Hendou, S., Lechat, P., de Truchis, P., Boufassa, F., Rossjohn, J., Delfraissy, J.F., Arenzana-SEISDEDOS, F., Chakrabarti, L.A., 2016. Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J. Clin. Invest.* 126, 2093–2108.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., de Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., Roederer, M., Koup, R.A., 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8 + T cells. *Blood* 107, 4781–4789.
- Binley, J.M., Lybarger, E.A., Crooks, E.T., Seaman, M.S., Gray, E., Davis, K.L., Decker, J.M., Wycuff, D., Harris, L., Hawkins, N., Wood, B., Nathe, C., richman, D., Tomaras, G.D., Bibollet-Ruche, F., Robinson, J.E., Morris, L., Shaw, G.M., Montefiori, D.C., Mascola, J.R., 2008. Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C. *J. Virol.* 82, 11651–11668.
- Braibant, M., Agut, H., Rouzioux, C., Costagliola, D., Autran, B., Barin, F., 2008. Characteristics of the env genes of HIV type 1 quasiespecies in long-term nonprogressors with broadly neutralizing antibodies. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* (1999) 47, 274–284.
- Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Lorin, V., Lortat-Jacob, H., Baleux, F., Bourdic, K., Noel, N., Lambotte, O., Mouquet, H., Schwartz, O., 2017. Lack of ADCC breadth of human nonneutralizing anti-HIV-1 antibodies. *J. Virol.* 91.
- Buckner, C.M., Kardava, L., Zhang, X., Gittens, K., Justement, J.S., Kovacs, C., Mcdermott, A.B., Li, Y., Sajadi, M.M., Chun, T.-W., Fauci, A.S., Moir, S., 2016. Maintenance of HIV-specific memory B-cell responses in elite controllers despite low viral burden. *J. Infect. Dis.* 214 (3), 390–398.
- Buckner, C.M., Moir, S., Ho, J., Wang, W., Posada, J.G., Kardava, L., Funk, E.K., Nelson, A.K., Li, Y., Chun, T.-W., Fauci, A.S., 2013. Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *J. Virol.* 87, 5800–5811.
- Bussmann, B.M., Reiche, S., Bieniek, B., Krznaric, I., Ackermann, F., Jassoy, C., 2010. Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. *Virology* 397, 7–13.
- Chung, A.W., Kumar, M.P., Arnold, K.B., Yu, W.H., Schoen, M.K., Dunphy, L.J., Suscovich, T.J., Frahm, N., Linde, C., Mahan, A.E., Hoffner, M., Strecek, H., Ackerman, M.E., Mcelrath, M.J., Schuitemaker, H., Pau, M.G., Baden, L.R., Kim, J.H., Michael, N.L., Barouch, D.H., Lauffenburger, D.A., Alter, G., 2015. Dissecting polyclonal vaccine-induced humoral immunity against HIV using systems serology. *Cell* 163, 988–998.
- Colineau, L., Rouers, A., Yamamoto, T., Xu, Y., Urrutia, A., Pham, H.P., Cardinaud, S., Samri, A., Dorcham, K., Coulon, P.G., Cheynier, R., Hosmalin, A., Oksenhendler, E., Six, A., Kelleher, A.D., Zaunders, J., Koup, R.A., Autran, B., Moris, A., Graff-Dubois, S., 2015. HIV-infected spleens present altered follicular helper T cell (T_{fh}) subsets and skewed B cell maturation. *PLoS One* 10, e0140978.
- Deeks, S.G., Schweighardt, B., Wrin, T., Galovich, J., Hoh, R., Sinclair, E., Hunt, P., McCune, J.M., Martin, J.N., Petropoulos, C.J., Hecht, F.M., 2006. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J. Virol.* 80, 6155–6164.
- Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., Mascola, J.R., Connors, M., 2010. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* 84, 1631–1636.
- Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Manion, M.M., O'Dell, S., Phogat, A., Chakrabarti, B., Hallahan, C.W., Migueles, S.A., Wrammert, J., Ahmed, R., Nason, M., Wyatt, R.T., Mascola, J.R., Connors, M., 2009. Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *J. Virol.* 83, 188–199.
- Dugast, A.S., Arnold, K., Lofano, G., Moore, S., Hoffner, M., Simek, M., Poignard, P., Seaman, M., Suscovich, T.J., Pereyra, F., Walker, B.D., Lauffenburger, D., Kwon, D.S., Keele, B.F., Alter, G., 2017. Virus-driven inflammation is associated with the development of bNAbs in spontaneous controllers of HIV. *Clin. Infect. Dis.* 64, 1098–1104.
- Fondere, J.-M., Hugu  t, M.-F., Macura-Biegun, A., Baillat, V., Ohayon, V., Reynes, J., Vendrell, J.-P., 2004. Detection and enumeration of circulating HIV-1-specific memory B cells in HIV-1-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* (1999) 35, 114–119.
- French, M.A., Center, R.J., Wilson, K.M., Fleyfel, I., Fernandez, S., Schorcht, A., Stratov, I., Kramski, M., Kent, S.J., Kelleher, A.D., 2013. Isotype-switched immunoglobulin G antibodies to HIV gag proteins may provide alternative or additional immune responses to 'protective' human leukocyte antigen-B alleles in HIV controllers. *AIDS (London, England)* 27, 519–528.
- Freund, N.T., Wang, H., Scharf, L., Nogueira, L., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Golijanin, J., Sievers, S.A., Sok, D., Cai, H., Cesar Lorenzi, J.C., Halper-Stromberg, A., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Gristick, H.B., van Gils, M.J., Sanders, R.W., Wang, L.X., Seaman, M.S., Burton, D.R., Gazumyan, A., Walker, B.D., West Jr., A.P., Bjorkman, P.J., Nussenzweig, M.C., 2017. Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. *Sci. Transl. Med.* 9.
- Good, K.L., Avery, D.T., Tangye, S.G., 2009. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J. Immunol.* 182, 890–901.

- Goujard, C., Chaix, M.L., Lambotte, O., Deveau, C., Sinet, M., Guernon, J., Cournaud, V., Rouzioux, C., Delfraissy, J.F., Venet, A., Meyer, L., Agence Nationale de Recherche Sur Le Sida, P. S. G., 2009. Spontaneous control of viral replication during primary HIV infection: when is "HIV controller" status established? *Clin. Infect. Dis.* 49, 982–986.
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Plaloux, G., Weiss, L., Costagliola, D., 2009. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 23, 1163–1169.
- Gray, E.S., Madiga, M.C., Hermanus, T., Moore, P.L., Wibmer, C.K., Tumba, N.L., Werner, L., Mlisana, K., Sibeko, S., Williamson, C., Abdool Karim, S.S., Morris, L., 2011. The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *J. Virol.* 85, 4828–4840.
- Gray, E.S., Moore, P.L., Choge, I.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., U, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., Shaw, G.M., Karim, S.S.A., Williamson, C., Morris, L., 2007. Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J. Virol.* 81, 6187–6196.
- Hatano, H., Delwart, E.L., Norris, P.J., Lee, T.-H., Dunn-Williams, J., Hunt, P.W., Hoh, R., Stramer, S.L., Linnen, J.M., McCune, J.M., Martin, J.N., Busch, M.P., Deeks, S.G., 2009. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J. Virol.* 83, 329–335.
- Hersperger, A.R., Migueles, S.A., Betts, M.R., Connors, M., 2011. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 169–173.
- Hraber, P., Seaman, M.S., Bailer, R.T., Mascola, J.R., Montefiori, D.C., Korber, B.T., 2014. Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. *AIDS* 28, 163–169.
- Hu, Z., Luo, Z., Wan, Z., Wu, H., Li, W., Zhang, T., Jiang, W., 2015. HIV-associated memory B cell perturbations. *Vaccine* 33, 2524–2529.
- Kardava, L., Moir, S., Shah, N., Wang, W., Wilson, R., Buckner, C.M., Santich, B.H., Kim, L.J.Y., Spurlin, E.E., Nelson, A.K., Wheatley, A.K., Harvey, C.J., McDermott, A.B., Wucherpfennig, K.W., Chun, T.-W., Tsang, J.S., Li, Y., Fauci, A.S., 2014. Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J. Clin. Invest.* 124, 3252–3262.
- Lambotte, O., Delfraissy, J.-F., 2005. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1 infected patients with a spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1053–1056.
- Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.-X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Delfraissy, J.-F., 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS (London, England)* 23, 897–906.
- Lambotte, O., Pollara, J., Boufassa, F., Moog, C., Venet, A., Haynes, B.F., Delfraissy, J.F., Saez-Cirion, A., Ferrari, G., 2013. High antibody-dependent cellular cytotoxicity responses are correlated with strong CD8 T cell viral suppressive activity but not with B57 status in HIV-1 elite controllers. *PLoS One* 8, e74855.
- Lane, H., Masur, H., Edgar, L., Whalen, G., Rook, A., Fauci, A., 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 309, 453–458.
- Li, M., Gao, F., Mascola, J.R., Stamatatos, L., Polonis, V.R., Koutsoukos, M., Voss, G., Goepfert, P., Gilbert, P., Greene, K.M., Biliska, M., Kothe, D.L., Salazar-Gonzalez, J.F., Wei, X., Decker, J.M., Hahn, B.H., Montefiori, D.C., 2005. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* 79, 10108–10125.
- Li, Y., Migueles, S.A., Welcher, B., Svehla, K., Phogat, A., Louder, M.K., Wu, X., Shaw, G.M., Connors, M., Wyatt, R.T., Mascola, J.R., 2007. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat. Med.* 13, 1032–1034.
- Lorin, V., Mouquet, H., 2015. Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 422, 102–110.
- Martin-Gayo, E., Cronin, J., Hickman, T., Ouyang, Z., Lindqvist, M., Kolb, K.E., Schulze Zur Wiesch, J., Cubas, R., Porichis, F., Shalek, A.K., van Lunzen, J., Haddad, E.K., Walker, B.D., Kaufmann, D.E., Lichterfeld, M., Yu, X.G., 2017. Circulating CXCR5+CXCR3+PD-1^{hi} Tfh-like cells in HIV-1 controllers with neutralizing antibody breadth. *JCI Insight* e89574, 2.
- Martinez, V., Costagliola, D., Bonduelle, O., N'Go, N., Schnuriger, A., Théodorou, I., Clauvel, J.P., Sicard, D., Agut, H., Debr  , P., Rouzioux, C., Autran, B., 2005. Combination of HIV-1-specific CD4 T_H1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term non progression. *J. Infect. Dis.* 191 (191), 2053–2063.
- Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., Connors, M., 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2709–2714.
- Mikell, I., Sather, D.N., Kalam, S.A., Altfeld, M., Alter, G., Stamatatos, L., 2011. Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. *PLoS Pathog.* 7, e1001251.
- Moir, S., Buckner, C.M., Ho, J., Wang, W., Chen, J., Waldner, A.J., Posada, J.G., Kardava, L., Shea, M.A.O., Kottitil, S., Chun, T.-W., Proschian, M.A., Fauci, A.S., 2010. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood* 116, 5571–5579.
- Moir, S., Fauci, A.S., 2013. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol. Rev.* 254, 207–224.
- Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., Dipoto, A.C., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottitil, S., Arthos, J., Proschian, M.A., Chun, T.-W., Fauci, A.S., 2008. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J. Exp. Med.* 205, 1797–1805.
- Moog, C., Fleury, H.J.A., Pellegrin, I., Kirn, A., Aubertin, A.M., 1997. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 71, 3734–3741.
- Morris, L., Binley, J.M., Clas, B.A., Bonhoeffer, S., Astill, T.P., Kost, R., Hurley, A., Cao, Y., Markowitz, M., Ho, D.D., Moore, J.P., 1998. HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 188, 233–245.
- Mouquet, H., 2014. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends Immunol.* 35, 549–561.
- Mouquet, H., Klein, F., Scheid, J.F., Warncke, M., Pietzsch, J., Oliveira, T.Y., Velinon, K., Seaman, M.S., Nussenzweig, M.C., 2011. Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. *PLoS One* 6, e24078.
- Mouquet, H., Warncke, M., Scheid, J.F., Seaman, M.S., Nussenzweig, M.C., 2012. Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 875–880.
- Ngo-Giang-Huong, N., Candotti, D., Goubar, A., Autran, B., Maynard, M., SICARD, D., Clauvel, J.P., Agut, H., Costagliola, D., Rouzioux, C., 2001. HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17, 1435–1446.
- Palmer, C.D., Romero-Tejeda, M., Scully, E.P., Lockhart, A., Seaman, M.S., Goldenthal, A., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Chibnik, L.B., Jost, S., Porichis, F., 2016. Increased frequencies of CD8+CD57+ T cells are associated with antibody neutralization breadth against HIV in viraemic controllers. *J. Int. AIDS Soc.* 19, 21136.
- Pensiero, S., Galli, L., Nozza, S., Ruffin, N., Castagna, A., Tambussi, G., Hejdeman, B., Misciagna, D., Riva, A., Malnati, M., Chiodi, F., Scarlatti, G., 2013. B-cell subset alterations and correlated factors in HIV-1 infection. *AIDS (London, England)* 27, 1209–1217.
- Pereyra, F., Addo, M.M., Kaufmann, D.E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., Ueda, P., Lu, Z., Cohen, D., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Rosenberg, E.S., Walker, B.D., 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 563–571.
- Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B.L., Wiegand, A., Rothchild, A.C., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M.S., Coffin, J.M., Walker, B.D., 2009. Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *J. Infect. Dis.* 200, 984–990.
- Piantadosi, A., Panteleeff, D., Blish, C.A., Baeten, J.M., Jaoko, W., McClelland, R.S., Overbaugh, J., 2009. Breadth of neutralizing antibody response to human immunodeficiency virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. *J. Virol.* 83, 10269–10274.
- Pinna, D., Corti, D., Jarrossay, D., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 2009. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur. J. Immunol.* 39, 1260–1270.
- Ranasinghe, S., Soghoian, D.Z., Lindqvist, M., Ghebremichael, M., Donaghey, F., Carrington, M., Seaman, M.S., Kaufmann, D.E., Walker, B.D., Porichis, F., 2015. HIV-1 antibody neutralization breadth is associated with enhanced HIV-specific CD4+ T cell responses. *J. Virol.* 90, 2208–2220.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J.G., Francis, D.P., Stablein, D., Bix, D.L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M.L., Michael, N.L., Kulasol, P., Kim, J.H., Investigators, M.-T., 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 361, 2209–2220.
- Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., Petropoulos, C.J., 2003. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4144–4149.
- Rodriguez, S.K., Sarr, A.D., Macneil, A., Thakore-Meloni, S., Gueye-Ndiaye, A., Traore, I., Dia, M.C., Mboup, S., Kanki, P.J., 2007. Comparison of heterologous neutralizing antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections. *J. Virol.* 81, 5331–5338.
- Rusert, P., Kouyos, R.D., Kadelka, C., Ebner, H., Schanz, M., Huber, M., Braun, D.L., Hoze, N., Scherrer, A., Magnus, C., Weber, J., Uhr, T., Cippa, V., Thorball, C.W., Kuster, H., Cavassini, M., Bernasconi, E., Hoffmann, M., Calmy, A., Battegay, M., Rauch, A., Yerly, S., Aubert, V., Klimkait, T., Boni, J., Fellay, J., Regoes, R.R., Gunthard, H.F., Trkola, A., Swiss, H.I.V.C.S., 2016. Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. *Nat. Med.* 22, 1260–1267.
- Sáez-Cir  n, A., Lacabartz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barr  sinoussi, F., Delfraissy, J.-F., Sinet, M., Pancino, G., Venet, A., 2007. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6776–6781.
- Sáez-Cir  n, A., Pancino, G., 2013. HIV controllers: a genetically determined or inducible phenotype? *Immunol. Rev.* 254, 281–294.
- Sajadi, M.M., Guan, Y., Devico, A.L., Seaman, M.S., Hossain, M., Lewis, G.K., Redfield, R.R., 2011. Correlation between circulating HIV-1 RNA and broad HIV-1 neutralizing antibody activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 57, 9–15.
- Sather, D.N., Armann, J., Ching, L.K., Mavrantoni, A., Sellhorn, G., Caldwell, Z., Yu, X., Wood, B., Self, S., Kalam, S., Stamatatos, L., 2009. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 83, 757–769.
- Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M.S., Velinon, K., Pietzsch, J., Ott, R.G., Anthony, R.M., Zebroski, H., Hurley, A., Phogat, A., Chakrabarti, B., Li, Y., Connors, M., Pereyra, F., Walker, B.D., Wardemann, H., Ho, D., Wyatt, R.T., Mascola, J.R., Ravetch, J.V., Nussenzweig, M.C., 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458, 636–640.
- Scheid, J.F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T.Y., Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., Velinon, K., Hurley, A., Myung, S., Boulard, F., Poignard, P., Burton, D.R., Pereyra, F., Ho, D.D., Walker, B.D., Seaman, M.S., Bjorkman, P.J., Chait,

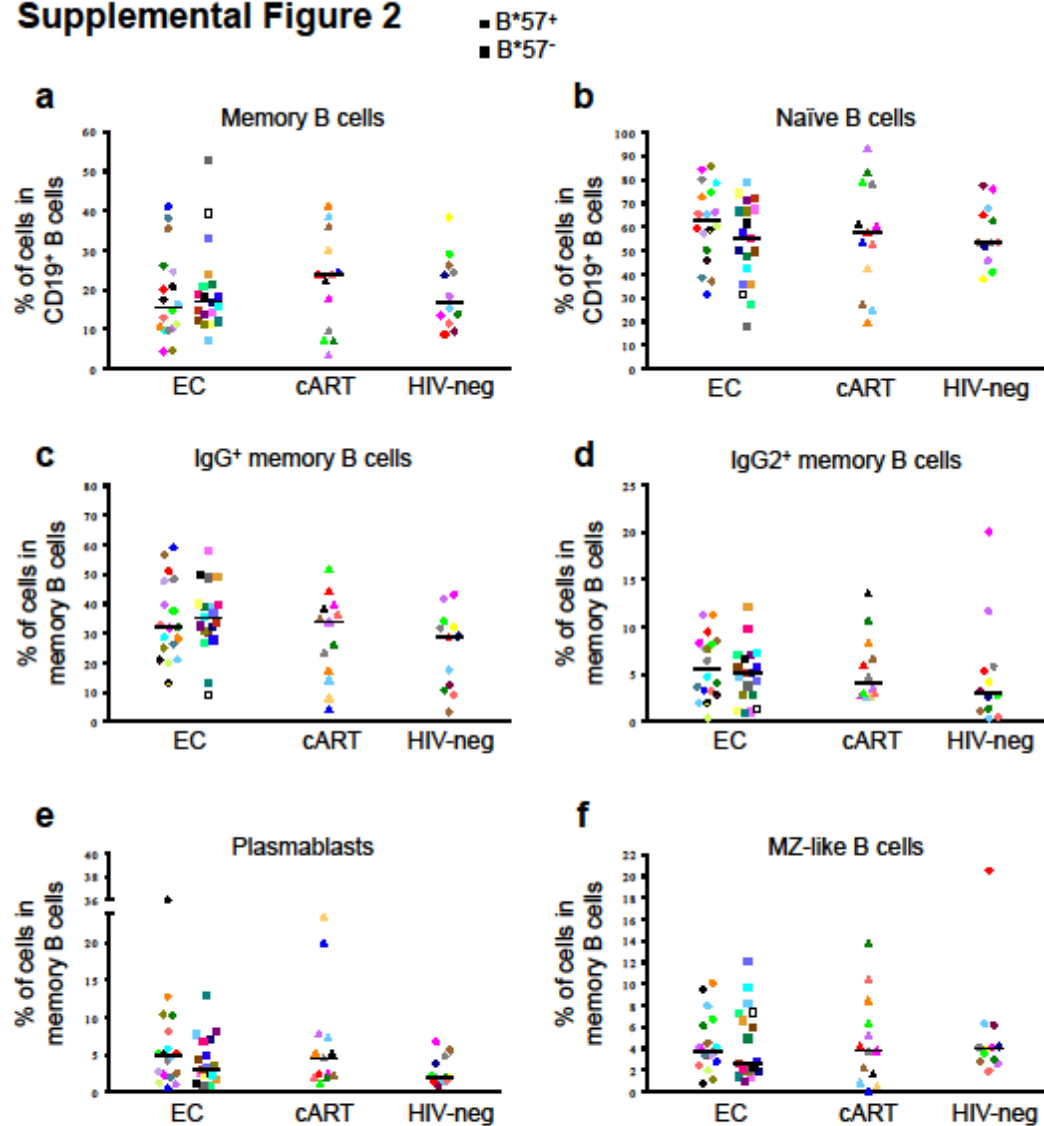
- B.T., Nussenzweig, M.C., 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333, 1633–1637.
- Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miro, G., Birungi, J., Pozniak, A., McPhee, D.A., Manigart, O., Karita, E., Inwoley, A., Jaoko, W., Dehovitz, J., Bekker, L.G., Pitisuttithum, P., Paris, R., Walker, L.M., Poignard, P., Wrin, T., Fast, P.E., Burton, D.R., Koff, W.C., 2009. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J. Virol.* 83, 7337–7348.
- Smalls-Mantey, A., Doria-Rose, N., Klein, R., Patamawenu, A., Migueles, S.A., Ko, S.Y., Hallahan, C.W., Wong, H., Liu, B., You, L., Scheid, J., Kappes, J.C., Ochsenaubauer, C., Nabel, G.J., Mascola, J.R., Connors, M., 2012. Antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary HIV-infected CD4+ T cells is directly associated with the magnitude of surface IgG binding. *J. Virol.* 86, 8672–8680.
- Sok, D., Burton, D.R., 2016. HIV broadly neutralizing antibodies: taking good care of the 98. *Immunity* 45, 958–960.
- Thongcharoen, P., Suriyanon, V., Paris, R.M., Khamboonruang, C., de Souza, M.S., Ratto-Kim, S., Karnasuta, C., Polonis, V.R., Baglyos, L., Habib, R.E., Gurunathan, S., Barnett, S., Brown, A.E., Bix, D.L., McNeil, J.G., Kim, J.H., Thai, A.V.E.G., 2007. A phase 1/2 comparative vaccine trial of the safety and immunogenicity of a CRF01_AE (subtype E) candidate vaccine: ALVAC-HIV (vCP1521) prime with oligomeric gp160 (92TH023/LAI-DID) or bivalent gp120 (CM235/SF2) boost. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 46, 48–55.
- Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., Cohen, M., Eron, J., Hicks, C.B., Liao, H.-X., Self, S.G., Landucci, G., Forthal, D.N., Weinhold, K.J., Keele, B.F., Hahn, B.H., Greenberg, M.L., Morris, L., Karim, S.S.A., Blattner, W.A., Montefiori, D.C., Shaw, G.M., Perelson, A.S., Haynes, B.F., 2008. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J. Virol.* 82, 12449–12463.
- Walker, B.D., Yu, X.G., 2013. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 487–498.
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D., Shaw, G.M., 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312.
- Yang, X., Farzan, M., Wyatt, R., Sodroski, J., 2000. Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 74, 5716–5725.

Supplemental Figure 1



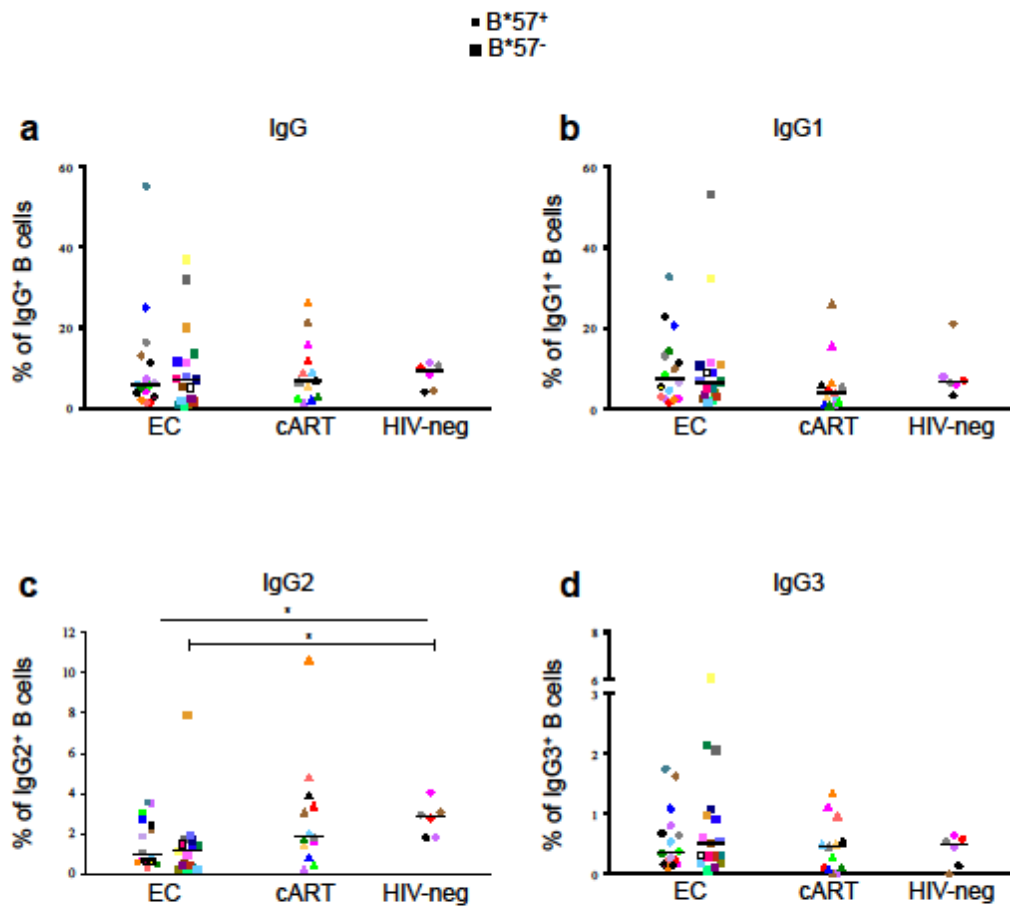
Supplemental Figure 1: Phenotypic analysis of circulating B cell populations using flow cytometry. B cells were identified using CD19, and further subdivided in naïve (CD27⁻IgD⁺), total memory B cells (CD27⁺ IgD⁻), activated memory (AM, CD27⁺CD21⁻), resting memory (RM, CD27⁺CD21⁺), intermediate memory (IM, CD27⁻CD21⁺), tissue-like memory (TLM, CD27⁻CD21⁻), plasmablasts (CD27⁺IgD⁻CD38^{high}) and marginal zone-like B cells (MZ-B cells, CD27⁺IgD⁻IgM⁺CD38⁻CD21⁺). IgG⁺ and IgG2⁺ memory B cells were also identified.

Supplemental Figure 2



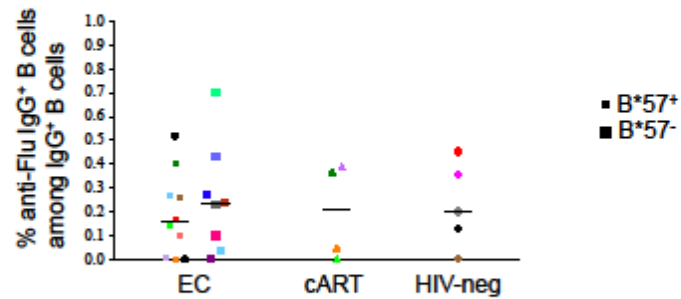
Supplemental Figure 2: Proportions of memory B cell populations in HIV⁺ patients and HIV⁻ donors. (a) Frequency of total memory B cells (CD27⁺IgD⁻) among CD19⁺ B cells. (b) Frequency of naïve B cells (CD27⁺IgD⁺) among CD19⁺ B cells. (c) Frequency of IgG⁺ cells among memory B cells. (d) Frequency of IgG2⁺ cells among memory B cells. (e) Frequency of CD38^{hi} plasmablasts among memory B cells. (f) Frequency of IgM⁺CD38⁺CD21⁺ MZ-like B cells among memory B cells. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Statistical significance was calculated using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test. Bars indicate median values; HIV-neg: HIV-negative donors.

Supplemental Figure 3



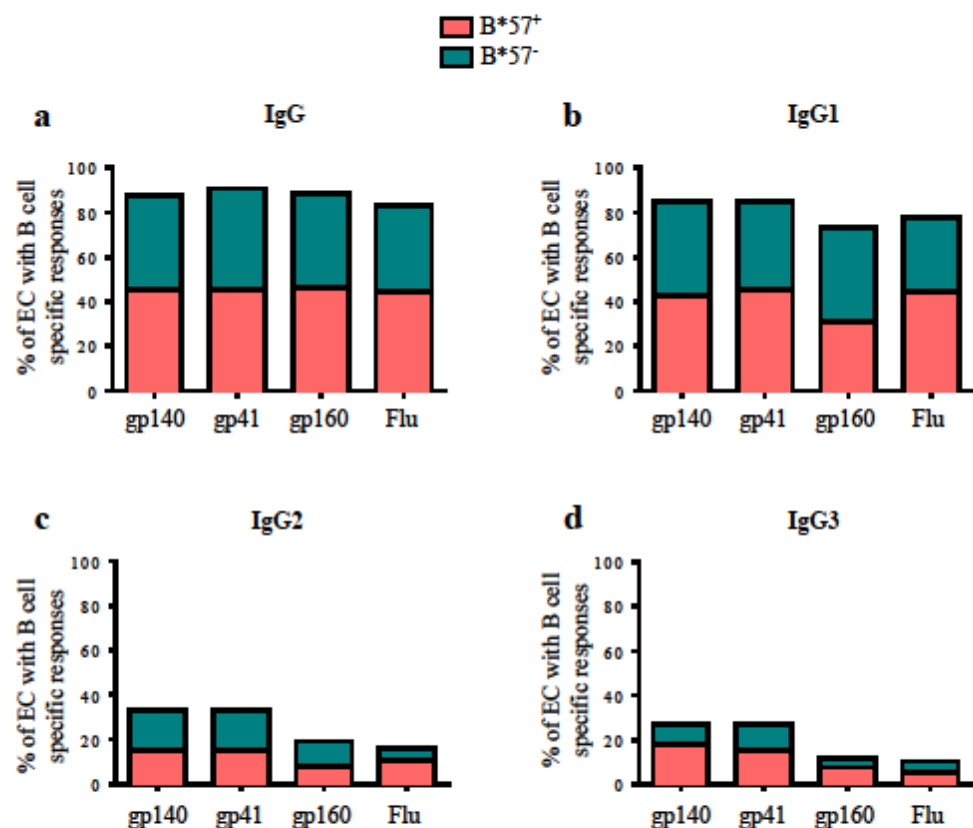
Supplemental Figure 3: Distribution and frequency of B cells according to their Ab isotype in HIV⁺ and HIV⁻ donors. Frequencies of B cells secreting IgG (a), IgG1 (b), IgG2 (c) or IgG3 (d) among total B cells in EC (circle: HLA-B*57⁺ or square: HLA-B*57⁻), cART and HIV-negative donors. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). Statistical significance were calculated using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test (*P < 0.05). Bars indicate median values.

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4 Memory B cell responses against Influenza vaccine antigens. Frequency of Flu-specific IgG⁺ B cells in EC, cART and HIV-negative donors. Each individual is represented by a specific dot on each graph (shape and color). circle: HLA-B*57⁺ EC; square: HLA-B*57⁻ EC. Statistical significance was calculated using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's test. Bars indicate median values.

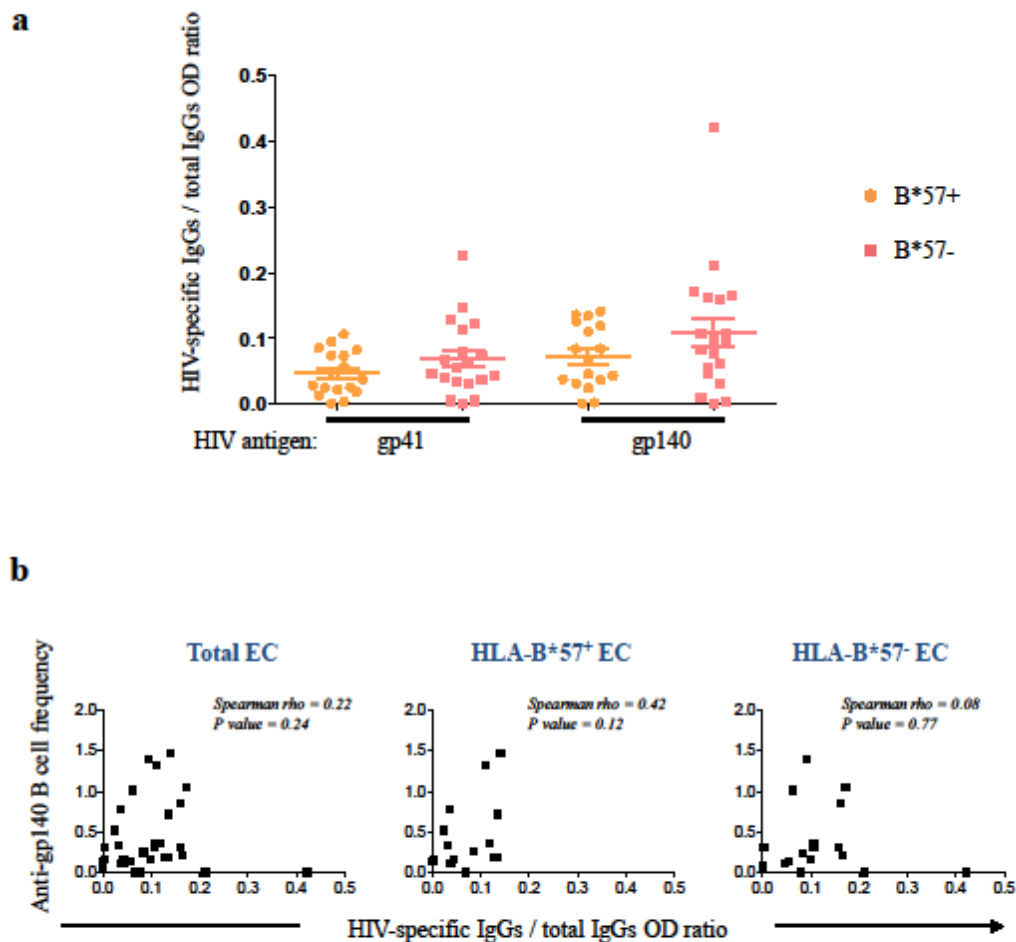
Supplemental Figure 5



Supplemental Figure 5: Proportion of HLA-B57+ and HLA-B57- EC responding to viral antigens.

HLA-B57+ EC (n=16) are represented in green and HLA-B*57- (n=17) in orange. Proportions of patient presenting (a) IgG+, (b) IgG1+, (c) IgG2+ and (d) IgG3+ B cell responses against HIV-Env antigens (gp140Yu2b, gp41S30 or gp160THO) and Influenza vaccine antigens (Flu, VAXIGRIP vaccine).

Supplemental Figure 6



Supplemental Figure 6: The quantity of HIV-specific IgG in patient's sera does not correlate with HIV-specific B cell frequency. (a) Quantity of HIV-specific IgG normalized to total IgG, evaluated using gp41 and gp140 HIV antigens, in sera from HLA-B*57+ (yellow circles) and HLA-B*57- (pink squares) EC. Bars indicate median values. (b) Spearman correlation between the anti-gp140 B cell frequency (among IgG+ B cells) and the ratio of anti-gp140 IgG Abs to total IgG Abs for all EC (left panel), HLA-B*57+ EC (middle panel) and HLA-B*57- EC (right panel).

Publication 3

Le profil d'anticorps permet de distinguer les patients contrôleurs du VIH (HIC) HLA-B*57+, HIC HLA-B*57- et les patients chroniques

Antibody profiles from HLA-B*57+ and HLA-B*57- HIV controllers discriminate from chronic progressors

Jéromine Klingler, Nicodème Paul, Géraldine Laumond, Sylvie Schmidt, Luzia M. Mayr, Thomas Decoville, Olivier Lambotte, Brigitte Autran, Seiamak Bahram, Christiane Moog, Cohorte ANRS CO21

Publication en fin de rédaction

Le manuscrit ci-après sera bientôt soumis à publication et correspond à la partie essentielle de mon travail de thèse.

Plusieurs études suggèrent que le contrôle de la réplication observé chez les HIC pourrait être dû à une réponse anticorps particulièrement efficace.

Dans cette étude, j'ai déterminé les quantités de différents isotypes et sous-types d'immunoglobulines (IgA, IgG, IgG2, IgG3) totales et spécifiques du VIH (anti-gp41 et anti-gp140) induites chez des patients HIC (n = 36) provenant de la cohorte ANRS CO21 CODEX et séparés en deux groupes en fonction de l'expression ou non de l'allèle HLA-B*57 : HIC HLA-B*57+ (n = 17) et HIC HLA-B*57- (n = 19), en comparaison à des patients chroniques non traités (n = 16). L'induction de tels anticorps varie en fonction des patients et de l'antigène reconnu. De manière remarquable, et bien que les HIC n'aient plus de charge virale détectable depuis plus de cinq ans, les quantités d'anticorps spécifiques du VIH détectées dans leurs sérums sont similaires à celles détectées chez les patients chroniques qui progressent vers la maladie.

J'ai ensuite analysé les activités neutralisantes des sérums des patients HIC et chroniques contre deux souches de référence (tier-1), 15 souches difficiles-à-neutraliser (tier-2), dont six souches « transmis/fondateurs » (*transmitted/founder*, T/F) (définies comme le variant ayant traversé la barrière épithéliale pour établir une nouvelle infection) et une souche T/F très difficile-à-neutraliser (tier-3). De façon très intéressante, j'ai observé une activité neutralisante des anticorps des patients HIC contre les virus T/F et tier-2. Cette activité était large (> 60 % des souches testées) pour certains HIC et particulièrement les HIC HLA-B*57+ (58 % des sérums neutralisent plus de 40 % des souches tier-2 chez les HIC HLA-B*57- contre

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH

47 % chez les HIC HLA-B*57+). Ainsi, même si les réponses sont plus faibles que celles des patients chroniques, les HIC, et notamment les HIC HLA-B*57-, conservent des anticorps démontrant une activité neutralisante vis-à-vis de différentes souches de VIH-1.

En plus de l'activité neutralisante, l'inhibition médiée par le domaine Fc des anticorps pourrait contribuer au contrôle du VIH. J'ai mis au point un test ADCC analysant directement la lyse de cellules infectées avec des virus isolés à partir de sérums de patients (et non un marqueur indirect de cette fonction inhibitrice comme dans de précédentes publications). Une activité de type ADCP détectant la phagocytose des complexes immuns en plus de la neutralisation a également été effectuée. Ces études m'ont permis de montrer que les patients HIC HLA-B*57+ présentaient des activités ADCC significativement plus élevées que celle détectées chez les patients HIC HLA-B*57- et que chez les patients chroniques.

Etant donné que des études récentes suggèrent que les IgG3 pourraient exercer des fonctions inhibitrices privilégiées (Yates et al. 2014) et présentent une forte affinité pour tous les récepteurs Fcγ (Gillis et al. 2014), nous avons analysé la fonction des IgG3 purifiées des sérums des patients HIC. Les activités de neutralisation et de phagocytose sont similaires pour les IgG3 et les IgG1,2,4 purifiées des sérums de patients HIC et chroniques tandis que les activités de neutralisation sont supérieures pour les IgG3 spécifiques du VIH. Les activités ADCC des IgG3 totales et spécifiques sont plus faibles que celles observées pour les IgG1,2,4. Ces résultats mettent en évidence le rôle central des IgG1,2,4 pour la fonction ADCC, alors que les IgG3 auraient des fonctions préférentielles de neutralisation.

Des études de corrélation entre les différents paramètres analysés, effectuées avec l'aide de P. Nicodème, montrent que les activités fonctionnelles des anticorps étaient fortement corrélées à l'induction des différents types d'anticorps anti-VIH dans les sérums des patients HIC HLA-B*57+, alors qu'elles ne le sont pas chez les HIC HLA-B*57- ou chez les patients chroniques. Ces résultats suggèrent une régulation différente des anticorps produits chez les patients HIC HLA-B*57+ par rapport aux HIC HLA-B*57- ou aux chroniques.

De façon très intéressante, le profil fonctionnel des anticorps induits dans les sérums permettait de distinguer, à lui seul les populations HIC HLA-B*57+, HIC HLA-B*57- et chroniques, ce qui suggère fortement que ces fonctions des anticorps participent au contrôle du VIH chez les patients HIC.

Antibody profiles from HLA-B*57+ and HLA-B*57- HIV controllers
discriminate from chronic progressors

Jéromine Klingler¹, Nicodème Paul¹, Géraldine Laumond¹, Sylvie Schmidt¹, Luzia M. Mayr¹,
Thomas Decoville^{1,2}, Olivier Lambotte^{3,4,5,6}, Brigitte Autran^{7,8}, Seiamak Bahram¹, Christiane
Moog^{1,2*}, ANRS CO21 Cohort

¹INSERM UMR_S 1109, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de
Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de
Strasbourg, Strasbourg, France

²Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, France

³Université Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

⁴INSERM UMR-1184, Center for Immunology of Viral Infections and Autoimmune Diseases,
Le Kremlin Bicêtre, France

⁵CEA, DSV/iMETI, Division of Immuno-Virology, IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France

⁶AP-HP, Service de Médecine Interne-Immunologie Clinique, Hôpitaux Universitaires Paris
Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

⁷Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM U1135, Center for Immunology and
Microbial Infections – CIMI-Paris, Paris, France

⁸AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Department of Immunology, Paris, France

* Corresponding author

E-mail: c.moog@unistra.fr

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) controllers (HICs), rare individuals able to spontaneously control HIV replication without treatment, represent a unique study group to identify the parameters associated to this control. We assessed the levels of total and HIV-specific immunoglobulin (Ig)A and IgG subtypes induction and their functional activities: neutralization, phagocytosis, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), according to their human leukocyte antigen (HLA)-B*57 status and compared it to non-treated chronic progressors. We found that, despite their undetectable viral load, HICs displayed HIV-specific IgG levels similar to those of chronic progressors. Interestingly, HICs' sub-grouping according to their HLA-B*57 status allowed detection of a statistically significant different distribution of functional antibody (Ab) responses (neutralization of tier-2 strains and ADCC). This functional Ab profile, by itself, allowed to discriminate HLA-B*57+ HICs from HLA-B*57- HICs and chronic progressors. This strongly suggests that HICs' peculiar Ab response participates in HIV control and therefore may be of major relevance for future Ab-driven vaccine design.

Introduction

An extremely rare proportion (< 1 %) of HIV infected individuals is able to spontaneously control the viral replication without combined antiretroviral therapy [1–3]. These individuals, defined as HIV controllers (HICs), provide a unique study group for identifying the parameters associated to this control. Among these parameters, the Ab response was only moderately studied, even though increasing evidence suggests that Abs induced by HICs have remarkable features that may be of interest for the design of an effective preventive or therapeutic HIV vaccine.

Different cellular or humoral responses may participate in the control of the infection observed

in these individuals. Indeed, most HICs display potent cytotoxic CD8 T cell responses against HIV-infected cells [4,5]. These strong cytotoxic responses are often associated with the expression of the HLA-B*57 allele [1,4,6]. Another study suggests that helper T cell responses may also contribute to the control of HIV, since HICs' HIV-specific CD4 T cells express high avidity T cell receptors [7]. This efficient T cell response may promote an adequate B cell response. Indeed, HIV-specific B cell responses were found to be preserved in HICs [8,9], with a particular B cell response in HLA-B*57+ HICs [9].

The triggering of B cell responses induces an HIV-specific Ab response. This anti-HIV Ab response is mainly of the IgG1 subtype, with variable proportions of other Ig isotype depending on individuals, HLA status, and clinical parameters [10–13]. Distinct IgG isotype distributions were reported according to the HIV status. Recent studies suggested that IgG1s and IgG3s are enriched in HICs' sera [13] and that HIV-specific IgG3s are decreased over time in chronic progressors and not in spontaneous controllers [14]. In this latter study, they also reported increased levels of HIV-specific IgG2s in chronic progressors compared to spontaneous controllers. However, others associated anti-HIV IgG2s with long-term non-progression [15,16] and particularly in the HLA-B*57- HIC subgroup [12]. These studies highlight the potential roles of Ig isotypes that may depend on the HLA-B*57 status of HICs but the functional role of this particular distribution of isotype was not assessed.

Concerning neutralizing activities, the results observed in distinct HIC cohorts are controversial, some showing low cross-neutralizing activities whereas others reporting higher neutralizing activities compared to viremic individuals [17–21]. In fact, neutralization activities among HICs are heterogeneous with some individuals presenting broad cross-neutralizing capacities, suggesting that the viral control in HICs may also be attributed to a particularly efficient Ab response [17–20].

In addition, non-neutralizing Ab responses were also detected in HICs. ADCC levels have been

shown to be higher in sera from HICs [19] and more particularly in the HLA-B*57- HIC subgroup [22]. Recently, the control of HIV has been linked to the capacity of HICs' sera to perform multiple effector functions such as antibody-dependent cell-mediated phagocytosis (ADCP), Fc binding and complement cascade activation, in addition to ADCC activities [13]. However, the authors did not link these Fc-mediated functions with neutralizing activities or with the patients' HLA-B*57 status.

In this study, we performed a complete and comprehensive analysis of the Ab response induced in HICs, assessing the levels of total and HIV-specific IgAs and IgG subtypes in parallel to functional activities of these Abs: neutralization and Fc-mediated activities i.e. phagocytosis and ADCC. These parameters were split up according to HICs' HLA-B*57 status and compared to a cohort of non-treated chronic progressors. We found that HICs display a particular functional Ab response with neutralizing activities against tier-2 and transmitted/founder (T/F) viruses and strong ADCC activities. These Ab functions allowed to discriminate HLA-B*57+ HICs, HLA-B*57- HICs and chronic progressors. Moreover, a strong positive correlation between HIV-specific Ab induced and functional activities was observed in HLA-B*57+ HICs and not in HLA-B*57- HICs or chronic progressors, further suggesting a specific humoral immune response associated to their HLA-B*57 status. Taken as a whole, the peculiar Ab response induced in HICs may have relevance for future Ab-driven vaccine design.

Results

Similar levels of anti-HIV Igs are induced in HICs and chronic progressors (CPs)

As Ig class switching may be central for the induction of an efficient functional Ab response, we measured HIV-specific (anti-gp41 and anti-gp140) IgAs, IgGs, IgG2s and IgG3s in sera from HICs, either positive (HLA-B*57+ (B*57+) HICs (n = 17)) or negative (HLA-B*57- (B*57-) HICs (n = 19)) for the HLA-B*57 allele. Historical sera from a cohort of chronic

progressors [23] (CPs) (n = 16) who were non-treated and still had reasonable levels of CD4 T cells counts with no sign of AIDS or profound immune suppression were used as control. The clinical and epidemiological characteristics of the study groups are detailed in Table 1.

We found a significantly higher ratio ($p = 0.03$) of anti-gp140 IgAs in CPs compared to B*57- HICs (Figs 1A and 5-II) while no statistical significance was observed between B*57+ HICs, B*57- HICs and CPs regarding the total IgA concentrations (S1A Fig).

Despite the HICs' undetectable viral loads, no statistical difference was observed between them and CPs for the anti-HIV IgG ratios (Fig 1B) even though B*57- HICs induced significantly lower concentrations of total IgGs compared to B*57+ HICs ($p = 0.03$) and CPs ($p = 0.003$) (S1B Fig and Fig 5-I).

No difference was observed between the 3 groups concerning the HIV-specific IgG2 (Fig 1C) and IgG3 levels (Fig 1D) nor for the total IgG2 (S1C Fig) and IgG3 concentrations (S1D Fig). However, HIV-specific IgG2s and IgG3s only represented a minor proportion (median ratio of 0.00003 and 0.002, respectively) of total IgG2s and IgG3s (Fig 1C and 1D) while about 10 % of total IgGs were HIV-specific (Fig 1B).

Even though we found less HIV-specific IgAs and less total IgGs in B*57- HICs, the overall Ab response was preserved in HICs, and especially in B*57+ HICs, compared to CPs.

Table 1. Clinical and epidemiological characteristics of the study groups.

		Code	Sex	Age	Infection (years)	HLA-B (1)	HLA-B (2)	VL RNA (copies/mL)	us VL RNA (copies/mL)	Proviral DNA (copies/10 ⁶ PBMC)	CD4 count (/mm ³)	Treatment
HIV controllers (HICs)	HLA-B*57+ HICs	H1	F	41	11	18	57	43	43	4	702	NO
		H2	M	48	8	53	57	< 40	3	351	801	NO
		H3	F	56	18	44	57	< 10	< 1	4	1400	NO
		H4	F	63	10	52	57	< 10	< 1	15	630	NO
		H5	F	57	17	57	NA	20	NA	7	999	NO
		H6	F	55	26	18	57	< 20	< 1	4	770	NO
		H7	M	51	26	51	57	42	17	24	824	NO
		H8	F	44	25	57	70(71)	240	NA	33	826	NO
		H9	M	50	26	44	57	< 20	< 13	NA	1201	NO
		H11	M	63	27	7	57	60	135	213	1022	NO
		H12	F	49	29	8	57	< 40	< 1	4	512	NO
		H13	M	51	24	7	57	47	NA	4	1020	NO
		H14	F	43	10	53	57	166	NA	27	862	NO
		H15	M	44	9	27	57	23	NA	4	979	NO
		H16	F	40	20	57	NA	< 20	< 1	16	880	NO
		H17	M	62	27	7	57	< 40	NA	NA	1074	NO
		H18	F	48	19	14(65)	57	< 20	< 1	4	279	NO
		B*57+ HICs median	/	50	20	/	/	/	30	7	862	/
	HLA-B*57- HICs	H19	F	34	13	40(60)	15(62)	< 40	NA	3	1078	NO
		H20	F	53	6	35	52	< 40	< 1	4	694	NO
		H21	F	40	6	18	NA	< 10	2	83	1130	NO
		H22	F	37	12	8	76	168	NA	159	529	NO
		H23	F	36	6	72	NA	153	NA	10	432	NO
		H24	F	48	24	27/81	71	61	NA	46	823	NO
		H25	M	40	23	27	45	< 40	1	13	585	NO
		H26	F	57	26	27	51	< 40	< 1	43	1060	NO
		H27	F	49	8	44	NA	< 20	< 1	126	853	NO
		H28	M	59	11	40(60)	15(62)	71	NA	26	519	NO
		H29	F	50	13	44	45	50	NA	19	723	NO
		H30	M	50	21	39	41	103	NA	109	504	NO
		H31	F	50	26	51	41	< 20	< 1	4	1311	NO
		H32	F	37	14	44	82	62	NA	3	500	NO
		H33	M	33	7	49	50	413	NA	42	600	NO
		H34	M	38	7	18	44	90	NA	127	1122	NO
		H35	M	52	10	35	40(60)	< 50	1	2	1234	NO
		H36	M	50	16	13	14	32	NA	3	1085	NO
		H37	M	48	27	27	51	< 20	22	23	561	NO
		B*57- HICs median	/	48	13	/	/	/	2	23	723	/
		All HICs median	/	49	17	/	/	/	10	16	825	/
Chronic progressors (CPs)	CP1	F	35	NA	NA	NA	NA	5300	/	NA	524	NO
	CP2	M	32	NA	NA	NA	NA	11000	/	NA	622	NO
	CP3	M	50	12	NA	NA	NA	63000	/	NA	310	NO
	CP4	F	36	2	NA	NA	NA	< 50	/	NA	948	NO
	CP5	M	46	4	NA	NA	NA	1700	/	NA	1430	NO
	CP6	M	35	17	NA	NA	NA	2450	/	NA	1360	NO
	CP7	F	50	17	NA	NA	NA	12500	/	NA	577	NO
	CP8	M	32	1	NA	NA	NA	42000	/	NA	1120	NO
	CP9	M	29	9	NA	NA	NA	1200	/	NA	454	NO
	CP10	M	28	4	NA	NA	NA	15000	/	NA	712	NO
	CP11	M	36	> 12	NA	NA	NA	< 200	/	NA	825	NO
	CP12	M	44	4	NA	NA	NA	< 200	/	NA	832	NO
	CP13	F	38	9	NA	NA	NA	23000	/	NA	147	NO
	CP14	M	32	3	NA	NA	NA	95	/	NA	679	NO
	CP15	M	33	8	NA	NA	NA	< 200	/	NA	731	NO
	CP16	F	35	NA	NA	NA	NA	9500	/	NA	215	NO
	Median	/	35	6	/	/	/	10250	/	/	696	/

F: female; HLA: human leukocyte antigen; M: male; NA: data not available; us: ultrasensitive;

VL: viral load; /: not applicable.

Neutralizing activities against some tier-2 strains are increased in B*57- HICs

Next, the ability of the sera from B*57+ HICs, B*57- HICs, and CPs to neutralize various HIV-1 strains was determined. In this experiment we used 2 reference (tier-1) strains, 15 difficult-to-neutralize tier-2 strains (including 6 T/F strains) and 1 highly difficult-to-neutralize tier-3 T/F strain (Fig 2).

Despite their low viral loads, we found that the sera from HICs still contained neutralizing Abs with median IRD50s similar to those of CPs. Indeed, no significant difference in the median neutralizing activity was observed for 10 of the 18 viruses tested, including the tier-1 strain SF162 and 8 of the 15 difficult-to-neutralize tier-2 strains (Fig 2A). The neutralizing activity of HICs was however significantly lower for the other tier-1 virus tested (BaL, $p = 0.01$) as well as for 7 tier-2 viruses ($p = 0.006$ for the virus CE0217, $p = 0.007$ for the virus CH106, $p = 0.001$ for the virus RHPA, $p = 0.003$ for the virus RHGA, $p = 0.04$ for the virus CE1176, $p = 0.006$ for the virus TRO11 and $p = 0.02$ for the virus BJOX2000). Hence, the overall median neutralizing activity was lower in HIC patients (median IRD50 = 1) compared to CPs (median IRD50 = 28) ($p < 0.0001$, not shown).

These lower neutralizing activities in HICs compared to CPs were also observed when analyzing the subgroups of B*57+ and B*57- HICs ($p = 0.048$ and $p = 0.02$ for the virus CE0217, $p = 0.01$ and $p = 0.03$ for the virus CH106, $p = 0.009$ and $p = 0.005$ for the virus RHPA, $p = 0.02$ and $p = 0.007$ for the virus RHGA, for B*57+ HICs and B*57- HICs, respectively, for B*57+ HICs: $p = 0.03$ for the virus CE1176, $p = 0.003$ for the virus TRO11 and $p = 0.008$ for the virus BJOX2000 and for B*57- HICs: $p = 0.008$ for the virus BaL) (Figs 2B and 5-III to X). Despite the overall lower neutralizing activity in HICs, B*57- HICs showed non-statistical higher median IRD50s compared to B*57+ HICs for the viruses BaL, QH0, CH106, X1632 and BJOX2000 (Figs 2B and 5-XVI to XIX) and compared to CPs for the viruses QH0 and X1632 (Figs 2B and 5-XVII and XVIII).

Some HICs were still able to neutralize a broad range of HIV-1 strains. Indeed, 23 % of B*57+ HICs and 16 % of B*57- HICs neutralized more than 60 % of the tested strains (Fig 2C upper panel).

Again, B*57- HICs displayed slightly broader neutralizing activities than B*57+ HICs with 53 and 58 % of B*57- HICs versus 41 and 47 % of B*57+ HICs neutralizing more than 40 % of total strains and tier-2 strains, respectively (Fig 2C upper and middle panels).

These results demonstrate that, despite the low levels of antigens detected in their blood, HICs and especially B*57- HICs induced and maintained high neutralizing activities following HIV control.

B*57+ HICs have stronger ADCC activities than B*57- HICs and CPs

As the Fc-mediated inhibitory activities may participate in the overall control of HIV replication, we analyzed the ADCC and phagocytosis activities with assays using viruses and infected cells. The ADCC assay was performed on 6 different HIV-1 tier-2 strains and the phagocytosis activity was determined concomitantly to neutralization by analyzing the inhibition of the HIV-1 SF162 strain replication on primary monocyte-derived macrophages (Mdm) [24] (Fig 3).

We observed that the median ADCC activities were higher in B*57+ HICs compared to CPs on the 6 strains tested. This increased activity was significant for 3 viruses ($p = 0.004$ for the virus X1632, $p = 0.07$ for the virus CE1176 and $p = 0.046$ for the virus CH119) (Figs 3 and 5-XI and XIII and XIV). B*57+ HICs also demonstrated increased ADCC activities compared to B*57- HICs on the 6 tested strains with a significant increase for the viruses TRO11 ($p = 0.001$) and CH119 ($p = 0.002$) (Figs 3 and 5-XII and XIII). Overall, HICs exhibited higher ADCC activities than CPs and when HICs were analyzed as a whole, ADCC was significantly

increased for 2 viruses ($p = 0.02$ for the virus X1632 and $p = 0.004$ for the virus CE1176, not shown).

Contrary to what was observed with ADCC, B*57+ HICs and B*57- HICs presented significantly lower IRD80s on infected macrophages compared to CPs ($p = 0.01$ and $p = 0.003$, respectively) (Figs 3 and 5-XV). Considering that this assay records a combination of both neutralization and phagocytosis activities [24] and that the median neutralization of the SF162 strain was not significantly different in the 3 cohorts of patients (Fig 2A), the increased activity observed in CPs may potentially be attributed to an increased phagocytosis activity.

Increased neutralization and decreased ADCC of HIV-specific IgG3s compared to IgG1,2,4s

Since the IgG3 subtype was associated with decreased risk of HIV infection and was proposed to display promising functional activities [25], we separated IgG3s from other IgG subtypes from the sera of 12 B*57+ HICs', 6 B*57- HICs' and 10 CPs. The IgG3 fractions were efficiently concentrated with a mean purity of 77 % and the remaining IgG1, 2, and 4 fractions (from now on called the IgG1,2,4 fraction) were successfully depleted from IgG3s (less than 2 % IgG3s in the remaining IgG1,2,4 fraction) (S2 Fig).

We studied the functional activities of the IgG3 and IgG1,2,4 fractions (Fig 4). The differences of functional activities between the 3 cohorts of patients were overall preserved after IgG3 purification, compared to IgG1,2,4 (Fig 4) or whole serum (Figs 2 and 3). Indeed, we found similar neutralization of SF162 in the 3 groups of patients (Fig 4A) and a significantly higher phagocytic activity (lower median IC50) was observed in CPs compared to both B*57+ HICs and B*57- HICs as observed for whole IgG (Fig 4B). When comparing IgG3 to IgG1,2,4 fractions, decreased neutralizing activity (increased median IC50) for purified IgG3s compared to the IgG1,2,4s for B*57- HICs ($p = 0.02$) (Fig 4A) and a decreased phagocytosis activity

(increased median IC₅₀) for B*57+ HICs ($p = 0.01$) was found (Fig 4B). Moreover, the purified IgG3 fraction demonstrated significantly lower ADCC activities (lower median AUCs) than the IgG1,2,4 fractions for the 3 groups of individuals ($p = 0.0002$ for B*57+ HICs, $p = 0.01$ for B*57- HICs and $p = 0.001$ for CPs) (Fig 4C). Overall, the purified IgG3 fractions displayed less functional activities than the remaining IgG1,2,4 fractions.

Given that the HIV-specific IgG3s represent a smaller proportion of the total IgG3s compared to HIV-specific IgGs (Fig 1B and 1D), we further determined the inhibitory potential of the IgG3 and IgG1,2,4 fractions when considering the HIV-specific IgG3s or IgG1,2,4s, respectively. To this end, we then multiplied the neutralization IC₅₀s, the phagocytosis IC₈₀s and the ADCC AUCs by the ratio of HIV-specific IgG3s or IgGs detected against gp140 (Fig 4D-F) and gp41 (not shown), respectively. When looking at the HIV-specific Igs detected for each isotype, we observed that neutralization ($p = 0.04$ for B*57+ HICs and $p = 0.007$ for CPs) was more potent for the anti-gp140 IgG3s *versus* the anti-gp140 IgG1,2,4s (Fig 4D) while activities recording neutralization + phagocytosis were similar between the HIV-specific IgG3s and IgG1,2,4s (Fig 4E). On the contrary, the anti-gp140 IgG3s exhibited lower ADCC activities than the anti-gp140 IgG1,2,4s ($p = 0.0009$ for B*57+ HICs, $p = 0.01$ for B*57- HICs and $p < 0.0001$ for CPs) (Fig 4F). A similar trend was observed for the anti-gp41 Igs (not shown).

Ab profiles from individuals controlling HIV are distinct from CPs

The study of the different Ab features gave an extensive profile for B*57+ HICs, B*57- HICs and CPs cohorts that we summarized as median values on a radar plot (Fig 5). For this representation, we excluded the high median neutralization values of SF162 to avoid constriction of all other values. Among these results, significant median differences between groups were annotated by red Roman numbers (I to XV). Non-statistical higher median values in B*57- HICs were annotated by yellow Roman numbers (XVI to XIX). Noteworthy, these

statistical differences were mainly recorded for neutralization of tier-2 strains, phagocytosis and ADCC, highlighting the fundamental role of these Ab functions for the discrimination of these groups.

Induction of HIV-specific Ab isotypes correlates with functional activities in B*57+ HICs

To further characterize the different Ab profiles in the 3 cohorts of patients, we searched for potential correlations between the different analyzed parameters (Fig 6).

In B*57+ HICs, the induction of HIV-specific Igs positively correlates (blue dots) between each isotype and with the Ab functions analyzed: neutralization, phagocytosis and ADCC activities (Fig 6A, blue triangle and rectangle). In contrast, this correlation was not observed in B*57- HICs, in all HICs (B*57+ HICs and B*57- HICs combined) and in CPs (Fig 6B-D, green triangles and rectangles). The correlation between HIV-specific Ab isotypes and Ab function exclusively observed in B*57+ HICs suggests that HIV-specific isotype commutation in this group of infected patients led to a particularly efficient Ab function.

In addition, ADCC and phagocytosis activities did not correlate with neutralization in HICs (Fig 6A-C, green rectangles) and even turned out as inverse correlation in CPs (Fig 6D, red rectangle). This highlights the distinct skills for Fc-mediated Ab functions in regard to classical Fab-mediated Ab neutralization.

Noteworthy, the levels of total IgGs positively correlated with neutralization in the cohort of CPs (Fig 6D blue rectangle) and this correlation was not found in the other groups. Moreover, all the neutralizing activities highly correlated with each other in CPs (blue triangle), suggesting that the humoral response induced by the high viral loads typically detected in these patients is overall beneficial for the development of an efficient neutralizing response. Interestingly, the non-statistical decrease of total IgG2s detected in B*57- HICs (S1 Fig) conveyed a strong negative correlation between this subtype and the other HIV-specific isotypes or the

neutralizing activities (Fig 6B, red rectangle). This inverse correlation raises the question of the role of IgG2s in this group of patients.

These results highlight the different Ab profiles of B*57+ HICs, B*57- HICs and CPs.

The Ab profile discriminates HICs from CPs and B*57+ HICs from B*57- HICs

The strikingly distinct Ab profile of HICs and CPs prompted us to generate a bi-dimensional representation of multicomponent characteristics of their Abs. Using the partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) model, we can show that HIC patients cluster in a different zone than CPs (Fig 7A). For this representation, the strongest correlates of distinction between HICs and CPs were neutralization activities ($p = 0.007$ for the neutralization of the virus RHGA) (Fig 7B).

In addition, B*57+ HICs clustered in a different zone than B*57- HICs (Fig 8A) and the ADCC activities ($p = 0.001$ for the virus TRO11 and $p = 0.002$ for the virus CH119) and the induction of total IgGs ($p = 0.03$) were the strongest correlates of distinction between these 2 groups (Fig 8B).

To summarize, these 3 cohorts, i.e. B*57+ HICs, B*57- HICs and CPs, clustered separately, based only on their Ab profile (S3 Fig).

Discussion

In this study, we performed an analysis of the Ab profile, assessing Ab types and isotypes, neutralization and Fc mediated functions found in a large cohort of HIC patients and compared these characteristics to those found in patients who progress to disease. By correlating these different parameters, we demonstrate that HICs can be differentiated from CPs by their Ab profile, and that B*57+ HICs display a different Ab response than B*57- HICs. This is the first

study connecting all the distinct Ab characteristics to obtain a comprehensive view of the Ab specificities associated with HIV control.

First, we found that the total and HIV-specific isotype levels did not differ drastically between the different patients groups, even though the analyzed HIC individuals had undetectable viral loads for more than 5 years. Previous studies analyzing HIV-specific isotypes in HICs showed contradictory results, where some studies showed higher levels of anti-Env and Vpu IgGs [26] in HICs or loss of HIV-specific IgG3s during progression [14], whereas others demonstrated lower levels of HIV-specific IgGs and IgG1 subtype in HICs compared to viremic controllers and non-controller patients [13]. Moreover, anti-HIV IgG2s were associated with long-term non-progression [15,16], particularly in the B*57- HIC subgroup [12]. In our study, we observed a significantly decreased total IgG response and a non-significant decrease of HIV-specific IgG2s in the subgroup of B*57- HICs. Moreover, B*57- HICs showed significantly lower levels of anti-gp140 IgAs. Previous studies analyzing HIV-specific IgA responses in HICs did not discriminate B*57+ HICs from B*57- HICs and showed contradictory results with similar or higher levels in HICs compared to viremic individuals [27,28].

The disparity of the results regarding HIV-specific isotopes induced following infection may be attributed to protocol discrepancies with a main disparity in antigen (epitope) used to detect HIV-specific Abs. Indeed, the detected HIV-specific Abs may rely on the type of envelope (monomeric or trimeric folded) and sequences used in the assay. The variable results observed may also be attributed to the progressor group that was selected as a control. Here, we used a historical group of samples collected from patients before the decline of their CD4 T cells levels (Table 1), implying that they were collected before profound immunosuppression. Taken as a whole, the lack of substantial decrease of HIV-specific Ab isotypes in HICs strongly suggest that the overall HIV-specific Ab response in these patients continues for a long period of time

despite antigen disappearance from the blood and/or that local low viral reservoirs are sufficient to maintain and sustain IgG and IgA maturation response.

In order to look at functional Ab responses, we first analyzed neutralizing activities. We found that HICs display heterogeneous neutralizing activities, some having neutralizing Ab levels similar to that observed in CPs. We used 15 pseudoviruses constructed with recently isolated tier-2 and T/F envelopes, therefore demonstrating that the cross-neutralizing activity detected in some of our HICs is directed against relevant, difficult-to-neutralize strains circulating in infected individuals. Previous studies showed similar results: i.e. very broad neutralizing activities in a subset (around 10%) of HICs [17–21,29]. We found that the overall neutralizing profile in HICs was nonetheless lower than in chronic progressors. This lower neutralization breadth was associated with a decreased viral quasispecies in HICs [30]. Indeed, high broadly neutralizing responses were associated with high viral loads and the presence of numerous escape viruses, able to efficiently prime the humoral response and select B cells specifically directed to conserved epitopes [29,31–33]. The reason for the induction of broadly neutralizing Abs (bnAbs) in some HICs is not yet understood. B cells producing bnAbs may be selected by chance, without the necessity of long lasting maturation in some individuals [34]. For example, HIV-specific IgG3 isotype induction, demonstrated here to display an efficient neutralizing activity in HICs, may have been selected at an earlier time point in the course of the Ab induction leading to resourceful virus destruction. Others suggested a unique inflammatory profile associated with a favorable evolution of the neutralizing Ab response [29]. Interestingly, we observed more bnAbs in B*57- HICs, suggesting that these Abs may actively participate in the early control of HIV in patients who are negative for the protective HLA-B*57 allele. On the contrary, we found that B*57+ HICs showed a strong correlation between neutralization and HIV-specific Abs detected in the sera. These results strengthen a previous observation showing a positive correlation between neutralization breadth and Env-specific memory B cells

in this group of B*57+ HICs [9]. This suggests that the efficient T cell response associated with the HLA-B*57 allele may lead to a preservation of HIV-specific memory B cells and to functional neutralizing Abs.

Increased body of evidence demonstrate the participation of non-neutralizing Fc-mediated Ab activities in the control of HIV replication [35–38]. In this study, we found repeatedly higher median ADCC activity in HICs compared to CPs for the 6 infectious molecular clones (IMCs) tested. Interestingly, previous studies also described higher ADCC activities in HICs compared to viremic individuals [19,22,26]. In these studies, indirect detection methods of cell lysis were used: gp120 coated cells [19], GranToxiLux (GTL) detection [22], interferon or CD107 activation on NK cells [26], or dimeric FcγRIIIa binding ELISA assays. Here, we were able to confirm the efficient ADCC activity in HICs using an ADCC assay detecting the lysis of infected cells. Moreover, we found significantly higher ADCC activities in B*57+ compared to B*57- HICs. Noteworthy, the opposite, i.e. higher activities in B*57- HICs than in B*57+ HICs, was previously described using an ADCC-GTL procedure [22]. Moreover Ackerman *et al.* found that HICs possess polyfunctional attributes with multiple functions including ADCP and complement deposit, suggesting a qualitatively superior functional Ab response [13]. However, they did not find enhanced ADCC activity among HICs using assays analyzing either CFSE loss from gp120 pulsed target cells and CD107a induced NK activation. Here we analyzed the phagocytosis of opsonized HIV-1 SF162 virus using an assay detecting FcγRI opsonized virus phagocytosis together with neutralization as previously described [24] and did not detect an increased phagocytic activity in HICs under these conditions. Whether the discrepancies between these studies are due to assay procedures need further investigations. In accordance with other studies, our data point to an increased ADCC activity in HICs, with a significantly higher ADCC effect in B*57+ HICs.

This higher ADCC activity did not correlate with the neutralizing activity in the 3 cohorts of patients studied. This is in accordance with a differential induction of Abs displaying these two functional activities as previously suggested [19,39,40].

In order to further investigate whether a particular Ab maturation profile may explain the functional activities detected in HICs, we analyzed the functional profile of IgG3s purified from HICs and chronic progressors. Indeed, IgG3s demonstrate high affinities for all Fcγ receptors [41]. Furthermore, this subtype was associated with a decreased risk of infection in the RV144 vaccine trial [25] and was proposed to be essential for the prevention of infection [42]. We found that HIV-specific IgG3s purified from HICs demonstrate stronger neutralizing activities but lower ADCC activities than IgG1,2,4s. However, because HIV-specific IgG3s only represent a small portion of the total IgG3s, the contribution of the IgG3 subtype in the functional Ab response recorded here and its association with HIV control has to be further investigated.

Overall, this extensive analysis of the Ab features in HICs allowed dissection of the interactions and relative contributions of the distinct Ab characteristics. Our results point to a particularly valuable induction of Abs with high HIV inhibitory functions, further supporting that Abs efficiently participate in HIV control in this particular cohort of HIV patients. Moreover the functional Ab profile by itself allows to discriminate B*57+ from B*57- HICs. This further highlights the central role of HIV-specific inhibitory Abs in HIV control. The singular Ab response induced in HICs gives additional hints on the relevant functional Abs that should be induced in future Ab-driven vaccine design.

Materials and methods

Cohorts and samples

HIV controllers (n = 36) were recruited from the CO21 CODEX cohort implemented by the ANRS (Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales). HICs were defined as HIV-infected individuals maintaining viral loads (VL) under 400 copies of HIV RNA/mL without combined antiretroviral therapy for more than 5 years. HICs were divided in 2 groups: HLA-B*57+ (B*57+ HICs, n = 17) or HLA-B*57- (B*57- HICs, n = 19). Their median viral loads were 30 and 2 copies/mL respectively and their median CD4 T cell rates were 862 and 723 /mm³, respectively.

Chronic progressors (CPs, n = 16) were recruited from the EP14 cohort, an historic cohort established in 2000, at the time when starting combined antiretroviral therapy immediately after HIV detection was not yet widely practiced. These individuals infected with a median of 6 years had still reasonable levels of CD4 T cells (median of 696 /mm³ at the time of blood sampling), showing some preservation of their immune response. However, they failed to control their viremia (median viral load of 10,250 copies/mL) and were close to get treated.

The clinical and epidemiological characteristics of the cohorts are shown in Table 1.

Ethic statement

All subjects provided their written informed consent to give their blood sample for research purposes. The CO21 CODEX cohort and this sub-study were funded and sponsored by ANRS and approved by the Ile de France VII Ethics Committee. The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Total and HIV-specific Ig detection by ELISA

96-well plates were coated overnight in carbonate buffer with the following proteins: 1 µg/mL of sheep anti-human IgA or IgG (Binding Site) for the detection of total IgAs or IgGs, respectively; 1 µg/mL of mouse anti-human IgG2 or IgG3 (Southern Biotech) for the detection of total IgG2s or IgG3s, respectively. For the detection of Env-specific Igs, plates were coated with 5 µg/mL of gp140Yu2b [43] or gp41S30 [44] for IgG2s and IgG3s, 2 µg/mL of antigens for IgAs and 0.5 µg/mL of antigens for IgGs. After saturation with PBS containing 5 % BSA, plates were incubated with diluted sera for 2 h at 37 °C. IgAs or IgGs, IgG2s and IgG3s were then detected by addition of a secondary goat anti-human IgA or IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Southern Biotech) for 1 h at 37 °C. Finally, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrate was added. After 30 min at room temperature, the reaction was stopped using 25 µL of H₂SO₄ per well and the optical density (OD) read at 450 nm (reference 650 nm).

The concentrations of total Igs were calculated using a reference serum.

The ratios of HIV-specific Igs to total Igs were calculated using this formula:

$$\text{OD ratio} = \frac{\text{OD of anti-gp41 or anti-gp140 Igs} * \text{serum dilution}}{\text{OD of total Igs} * \text{serum dilution}}$$

IgG purification

IgGs were purified from patients' sera using a G Sepharose™ 4 Fast Flow protein column (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

In a subset of HICs and CPs (i.e. when the amount of serum was sufficient for further IgG subtype purification), IgG3s were separated from purified IgGs using an A Sepharose™ 4 Fast Flow protein column (Thermo Scientific). The fraction not retained on the column contained the IgG3s while the IgG1, 2, and 4s were eluted in the fraction retained on the column.

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood using Ficoll-Hypaque sedimentation and were then frozen in liquid nitrogen or cultured overnight in RPMI-1640, 10 % FCS, and 50 IU interleukin-2 (R&D Systems). The blood was received from healthy volunteers at the Blood Transfusion Center (EFS) in Strasbourg.

Using an AutoMACS (Miltenyi Biotec) for immunomagnetic bead isolation, monocytes were isolated from the PBMCs with anti-CD14 beads. Monocyte-derived macrophages (Mdm) were obtained by differentiation of CD14⁺ cells by incubation with AIM V (Gibco) without SVF, Glutamax 1X (Gibco) and GM-CSF (100 U/mL) (R&D Systems) for 5 days at 37 °C, 5 % CO₂. The MdMs were then frozen in liquid nitrogen.

The CEM.NKR.CCR5 cell line was kindly provided by G. Ferrari (Duke University, USA).

TZM-bl neutralization assays

For neutralization, pseudoviruses were produced by cotransfecting 293T cells with HIV-1 Env expression plasmid SF162.LS, BaL, QH0692.42 and YU2 and the Env-deficient HIV-1 backbone plasmid pSG3ΔEnv.

HIV-1 infectious molecular clones (IMCs): CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18, REJO4541.67, TRJO4551.58, RHGA, X1632_S2_B10, TRO.11, CE703010217_B6, CH119.10, BJOX2000.03.2 and CE1176_A3 were produced by 293T cell transfection. These different strains were obtained through the NIH AIDS reagent program.

Sera were tested for their ability to neutralize HIV-1 using the TZM-bl neutralization assay as described previously [45]. As negative controls, HIV-negative sera purchased at the Blood Transfusion Center (EFS) in Strasbourg were used and the capacity of individuals' sera to neutralize murine leukemia virus (MuLV) was assessed. Two tier-1 reference strains (SF162.LS and BaL), 15 tier-2 strains (QH0692.42, YU2, CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18,

REJO4541.67, RHGA, X1632_S2_B10, TRO.11, CE703010217_B6, CH119.10, BJOX2000.03.2 and CE1176_A3) and 1 tier-3 strain (TRJO4551.58) were used. CH058, CH077, CH106, RHPA, THRO4156.18, REJO4541.67 and TRJO4551.58 are transmitted/founder (T/F) viruses.

The inhibitory reciprocal dilution 50 % (IRD50) or the inhibitory concentration 50 % (IC50) were respectively defined as the reciprocal sample dilution or the sample concentration leading to a 50 % reduction in relative luminescence units (RLU).

Neutralization + phagocytosis assay

Sera were tested for their ability to neutralize HIV-1 using MdMs as target cells. The MdMs were infected with SF162.LS. After 36 h, the MdMs were stained for intracellular p24 (KC57-RD1-FITC; Beckman Coulter).

The inhibitory reciprocal dilution 80 % (IRD80) or the inhibitory concentration 80 % (IC80) were respectively defined as the reciprocal sample dilution or the sample concentration leading to an 80 % reduction in the percentage of infected cells.

Luciferase ADCC assay

The ADCC assay was performed using purified PBMCs as effector cells and the CEM.NKR.CCR5 cell line was infected with HIV-1 IMCs expressing the viral envelope and the Renilla luciferase reporter gene (HIV-1 LucR: X1632_S2_B10, TRO.11, CE703010217_B6, CH119.10, BJOX2000.03.2 and CE1176_A3) as target cells. The HIV-1 LucR were obtained from D. Montefiori (Duke University, USA). After 4 days of infection, CEM.NKR.CCR5 cells were stained for intracellular p24 (KC57-RD1-FITC; Beckman Coulter) and experiments were carried out only if at least 10 % of the cells were infected. 12,500 HIV-1 infected CEM.NKR.CCR5 cells were plated in 12.5 µL of RPMI-1640, 10 % FCS, and

50 IU interleukin-2 (R&D Systems) in a U-bottom 96-well-plate and mixed with 375,500 PBMCs in 12.5 µL of the same medium (30/1 effector/target ratio). 25 µL of the diluted samples (sera or purified IgGs) were added. Four hours later, 25 µL of 60 µM VivirenTM substrate (Promega) was added to determine the luminescence intensity generated by target cells not lysed by ADCC-mediating Abs present in the patient's samples. The percentage of target cell lysis was normalized to control wells without Abs using the following formula:

$$\% \text{ of lysis} = \left(\frac{\text{RLU of infected target cells with effectors} - \text{RLU of infected target cells with effectors and samples}}{\text{RLU of infected target cells with effectors}} \right) * 100$$

This takes into account the decreased infection rate due to direct lysis in the absence of Abs coming from the samples.

The AUC was calculated as the integrated background-subtracted net activity over a range of dilutions using the trapezoidal method and was truncated above zero.

Radar charts

The radar chart shows a descriptive representation of the Ab profiles from HICs and chronic progressors. It highlights the difference between the different patients groups along the different Ab features. For each group, the median statistic was used as summary value. The radar chart was drawn using the fmsd R library (<https://cran.r-project.org/web/packages/fmsb>).

Partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA)

In order to identify the Ab features that could potentially explain the differences between the different patients groups, we performed a discriminant analysis using PLS-DA [46] (partial least-squares discriminant analysis), a multivariate dimensionality-reduction tool.

The graphical representation of the results obtained with PLS-DA are shown with the profiles that could explain the separation, ordered from the most important one at the bottom to the least important one at the top. The contribution of each feature is represented as a barplot in which

each bar length corresponds to the loading weight (importance) of the feature. The loading weight can be positive or negative. These features that are supposed to explain the separation were selected using sPLS-DA [47] (sparsed partial least-squares discriminant analysis). For accurate estimation, we used a 5-fold cross-validation scheme repeated 50 times leading to a global classification error rate of 15 %.

Statistical analysis

The statistical significance (p-values) was determined using a two-tailed Mann-Whitney test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$) using Prism software (GraphPad).

The associations between continuous variables were evaluated using a Spearman rank order correlation test using “Visualization of a Correlation Matrix” R package version 0.77 (<https://CRAN.R-project.org/package=corrplot>).

Acknowledgements

We thank all participants of the ANRS CO21 cohort. This work was granted by the ANRS (Agence nationale de recherches sur le SIDA et les hépatites virales), the Investissements d’Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77. J.K. was the recipient of a Ministère de la Recherche doctoral fellowship, followed by a Sidaction fellowship. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

References

1. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, Nguyen A, Goujard C, Meyer L, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control

- of viral replication. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2005 Oct 1;41(7):1053–6.
2. Grabar S, Selinger-Leneman H, Abgrall S, Pialoux G, Weiss L, Costagliola D. Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS Lond Engl.* 2009 Jun 1;23(9):1163–9.
 3. Sáez-Cirión A, Pancino G. HIV controllers: a genetically determined or inducible phenotype? *Immunol Rev.* 2013 Jul;254(1):281–94.
 4. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood.* 2006 Jun 15;107(12):4781–9.
 5. Sáez-Cirión A, Lacabartz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 17;104(16):6776–81.
 6. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, et al. HIV-specific CD8⁺ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):1061–8.
 7. Benati D, Galperin M, Lambotte O, Gras S, Lim A, Mukhopadhyay M, et al. Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J Clin Invest.* 2016 Jun 1;126(6):2093–108.
 8. Buckner CM, Kardava L, Zhang X, Gittens K, Justement JS, Kovacs C, et al. Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burdens. *J Infect Dis.* 2016 Apr 27;

9. Rouers A, Klingler J, Su B, Samri A, Laumond G, Even S, et al. HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection. *EBioMedicine*. 2017 May 31;
10. Binley JM, Lybarger EA, Crooks ET, Seaman MS, Gray E, Davis KL, et al. Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C. *J Virol*. 2008 Dec;82(23):11651–68.
11. Banerjee K, Klasse PJ, Sanders RW, Pereyra F, Michael E, Lu M, et al. IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Apr;26(4):445–58.
12. French MA, Center RJ, Wilson KM, Fleyfel I, Fernandez S, Schorcht A, et al. Isotype-switched immunoglobulin G antibodies to HIV Gag proteins may provide alternative or additional immune responses to “protective” human leukocyte antigen-B alleles in HIV controllers. *AIDS Lond Engl*. 2013 Feb 20;27(4):519–28.
13. Ackerman ME, Mikhailova A, Brown EP, Dowell KG, Walker BD, Bailey-Kellogg C, et al. Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog*. 2016 Jan 8;12(1):e1005315.
14. Sadanand S, Das J, Chung AW, Schoen MK, Lane S, Suscovich TJ, et al. Temporal variation in HIV-specific IgG subclass antibodies during acute infection differentiates spontaneous controllers from chronic progressors. *AIDS Lond Engl*. 2018 Feb 20;32(4):443–50.
15. Ngo-Giang-Huong N, Candotti D, Goubar A, Autran B, Maynard M, Sicard D, et al. HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Oct 10;17(15):1435–46.

16. Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, Théodorou I, et al. Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J Infect Dis.* 2005 Jun 15;191(12):2053–63.
17. Bailey JR, Lassen KG, Yang H-C, Quinn TC, Ray SC, Blankson JN, et al. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2006 May;80(10):4758–70.
18. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, Rathod A, et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):563–71.
19. Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao H-X, Parks RJ, et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS Lond Engl.* 2009 May 15;23(8):897–906.
20. Sajadi MM, Guan Y, DeVico AL, Seaman MS, Hossain M, Lewis GK, et al. Correlation between circulating HIV-1 RNA and broad HIV-1 neutralizing antibody activity. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 2011 May 1;57(1):9–15.
21. González N, McKee K, Lynch RM, Georgiev IS, Jimenez L, Grau E, et al. Characterization of broadly neutralizing antibody responses to HIV-1 in a cohort of long term non-progressors. Ariën KK, editor. *PLOS ONE.* 2018 Mar 20;13(3):e0193773.
22. Lambotte O, Pollara J, Boufassa F, Moog C, Venet A, Haynes BF, et al. High antibody-dependent cellular cytotoxicity responses are correlated with strong CD8 T cell viral suppressive activity but not with B57 status in HIV-1 elite controllers. *PloS One.* 2013;8(9):e74855.

23. Burren R, Salmon-Ceron D, Richert S, Pancino G, Spiridon G, Haessig S, et al. Immunoglobulin G (IgG) and IgA, but also nonantibody factors, account for in vitro neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by serum and plasma of HIV-infected patients. *J Virol*. 2001 Jun;75(11):5421–4.
24. Holl V, Hemmerter S, Burren R, Schmidt S, Bohbot A, Aubertin A-M, et al. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Nov 15;173(10):6274–83.
25. Chung AW, Ghebremichael M, Robinson H, Brown E, Choi I, Lane S, et al. Polyfunctional Fc-effector profiles mediated by IgG subclass selection distinguish RV144 and VAX003 vaccines. *Sci Transl Med*. 2014 Mar 19;6(228):228ra38.
26. Madhavi V, Wines BD, Amin J, Emery S, ENCORE1 Study Group, Lopez E, et al. HIV-1 Env- and Vpu-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Associated with Elite Control of HIV. *J Virol*. 2017 Sep 15;91(18).
27. Ruiz MJ, Ghiglione Y, Falivene J, Laufer N, Holgado MP, Socías ME, et al. Env-Specific IgA from Viremic HIV-Infected Subjects Compromises Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J Virol*. 2015;90(2):670–81.
28. Nabi R, Moldoveanu Z, Wei Q, Golub ET, Durkin HG, Greenblatt RM, et al. Differences in serum IgA responses to HIV-1 gp41 in elite controllers compared to viral suppressors on highly active antiretroviral therapy. *PloS One*. 2017;12(7):e0180245.
29. Dugast A-S, Arnold K, Lofano G, Moore S, Hoffner M, Simek M, et al. Virus-driven inflammation is associated with the development of bNAbs in spontaneous controllers of HIV. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2017 Feb 3;

30. Pernas M, Sanchez-Merino V, Casado C, Merino-Mansilla A, Olivares I, Yuste E, et al. HIV-1 Dual Infected LTNP-EC Patients Developed an Unexpected Antibody Cross-Neutralizing Activity. Vartanian J-P, editor. PLOS ONE. 2015 Aug 10;10(8):e0134054.
31. Mikell I, Sather DN, Kalams SA, Altfeld M, Alter G, Stamatatos L. Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. PLoS Pathog. 2011 Jan 13;7(1):e1001251.
32. Sather DN, Armann J, Ching LK, Mavrantoni A, Sellhorn G, Caldwell Z, et al. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol. 2009 Jan;83(2):757–69.
33. Rusert P, Kouyos RD, Kadelka C, Ebner H, Schanz M, Huber M, et al. Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. Nat Med. 2016 Nov;22(11):1260–7.
34. Freund NT, Wang H, Scharf L, Nogueira L, Horwitz JA, Bar-On Y, et al. Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. Sci Transl Med. 2017 Jan 18;9(373):eaal2144.
35. Forthal, Landucci G, Daar ES. Antibody from patients with acute human immunodeficiency virus (HIV) infection inhibits primary strains of HIV type 1 in the presence of natural-killer effector cells. J Virol. 2001 Aug;75(15):6953–61.
36. Florese RH, Van Rompay KKA, Aldrich K, Forthal DN, Landucci G, Mahalanabis M, et al. Evaluation of passively transferred, nonneutralizing antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating IgG in protection of neonatal rhesus macaques against oral SIVmac251 challenge. J Immunol Baltim Md 1950. 2006 Sep 15;177(6):4028–36.
37. Florese RH, Demberg T, Xiao P, Kuller L, Larsen K, Summers LE, et al. Contribution of nonneutralizing vaccine-elicited antibody activities to improved protective efficacy in rhesus macaques immunized with Tat/Env compared with multigenic vaccines. J Immunol Baltim Md 1950. 2009 Mar 15;182(6):3718–27.

38. Horwitz, Bar-On Y, Lu C-L, Fera D, Lockhart AAK, Lorenzi JCC, et al. Non-neutralizing Antibodies Alter the Course of HIV-1 Infection In Vivo. *Cell*. 2017 Jul 26;
39. Smalls-Mantey A, Doria-Rose N, Klein R, Patamawenu A, MIGUELES SA, Ko S-Y, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary HIV-infected CD4+ T cells is directly associated with the magnitude of surface IgG binding. *J Virol*. 2012 Aug;86(16):8672–80.
40. Stanfield-Oakley SA, Pollara J, deCamp A, Korber B, LaBranche C, Ochsenbauer C, et al. Identification of a Panel of IMC to define breadth and potency of ADCC responses. In: *Keystone Symposia X8. Olympic Valley, CA (2016).*;
41. Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F, Bruhns P. Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol*. 2014;5:254.
42. Yates NL, Liao H-X, Fong Y, deCamp A, Vandergrift NA, Williams WT, et al. Vaccine-induced Env V1-V2 IgG3 correlates with lower HIV-1 infection risk and declines soon after vaccination. *Sci Transl Med*. 2014 Mar 19;6(228):228ra39.
43. Lorin V, Mouquet H. Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2015 Jul;422:102–10.
44. Krell T, Greco F, Engel O, Dubayle J, Dubayle J, Kennel A, et al. HIV-1 gp41 and gp160 are hyperthermostable proteins in a mesophilic environment. Characterization of gp41 mutants. *Eur J Biochem FEBS*. 2004 Apr;271(8):1566–79.
45. Li M, Gao F, Mascola JR, Stamatatos L, Polonis VR, Koutsoukos M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*. 2005 Aug;79(16):10108–25.

46. Pérez-Enciso M, Tenenhaus M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. Hum Genet. 2003 May;112(5–6):581–92.
47. Lê Cao K-A, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. BMC Bioinformatics. 2011 Jun 22;12:253.

Figures

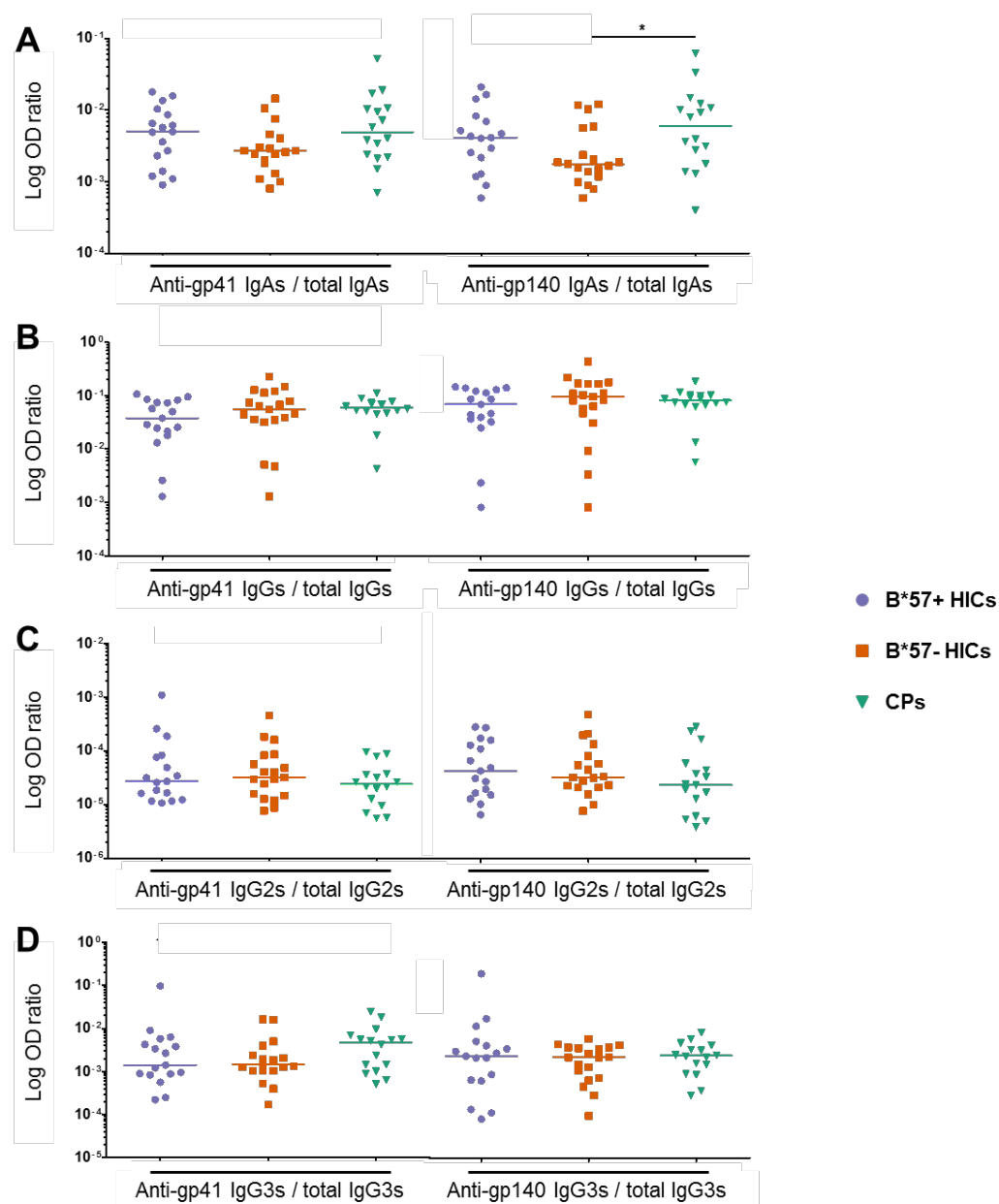


Fig 1. Similar levels of anti-HIV IgAs are induced in HICs compared to CPs.

(A) Optical density (OD) ratio (Log 10) of anti-gp41 IgAs (left panel) or anti-gp140 IgAs (right panel) to total IgAs for HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, $n = 17$, purple circles), HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, $n = 19$, orange squares) and chronic progressors (CPs, $n = 16$, green triangles). (B) Same for IgGs, (C) IgG2s and (D) IgG3s. The statistical significance calculated using a Mann-Whitney test is indicated (*: $p < 0.05$). The horizontal bars represent the median of OD ratios for each patient group.

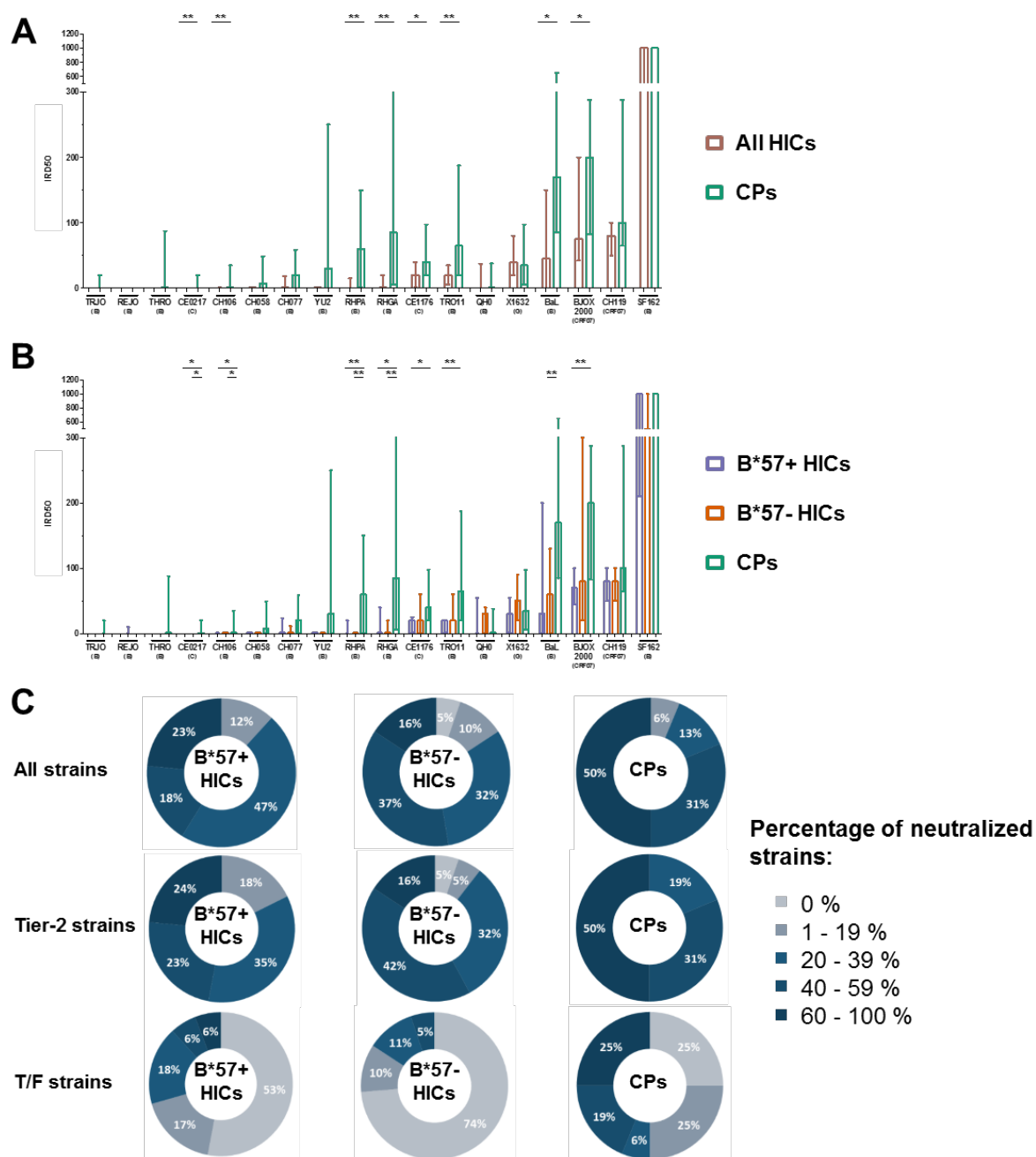


Fig 2. Neutralizing activities against tier-2 strains are increased in B*57- HICs.

Sera from HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, n = 17), HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, n = 19) and chronic progressors (CPs, n = 16) were tested against 18 HIV-1 strains including 15 tier 2 strains and 7 T/F strains. (A) The median neutralization IRD50s with interquartile ranges are represented for all HICs (red) and CPs (green). (B) The median neutralization IRD50s with interquartile ranges are represented for B*57+ HICs (purple), B*57- HICs (orange) and CPs (green). The statistical significances calculated using a Mann-Whitney test are indicated (*: p

< 0.05 , **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). (C) The neutralization breadth is expressed as the percentage of patients able to neutralize 0 %, 1 to 19 %, 20 to 39 %, 40 to 59 % and 60 to 100 % of all strains (upper panel), tier 2 strains (middle panel) and T/F strains (lower panel) for B*57+ HICs (left), B*57- HICs (middle) and CPs (right). The percentages of patients for each fraction are indicated in white.

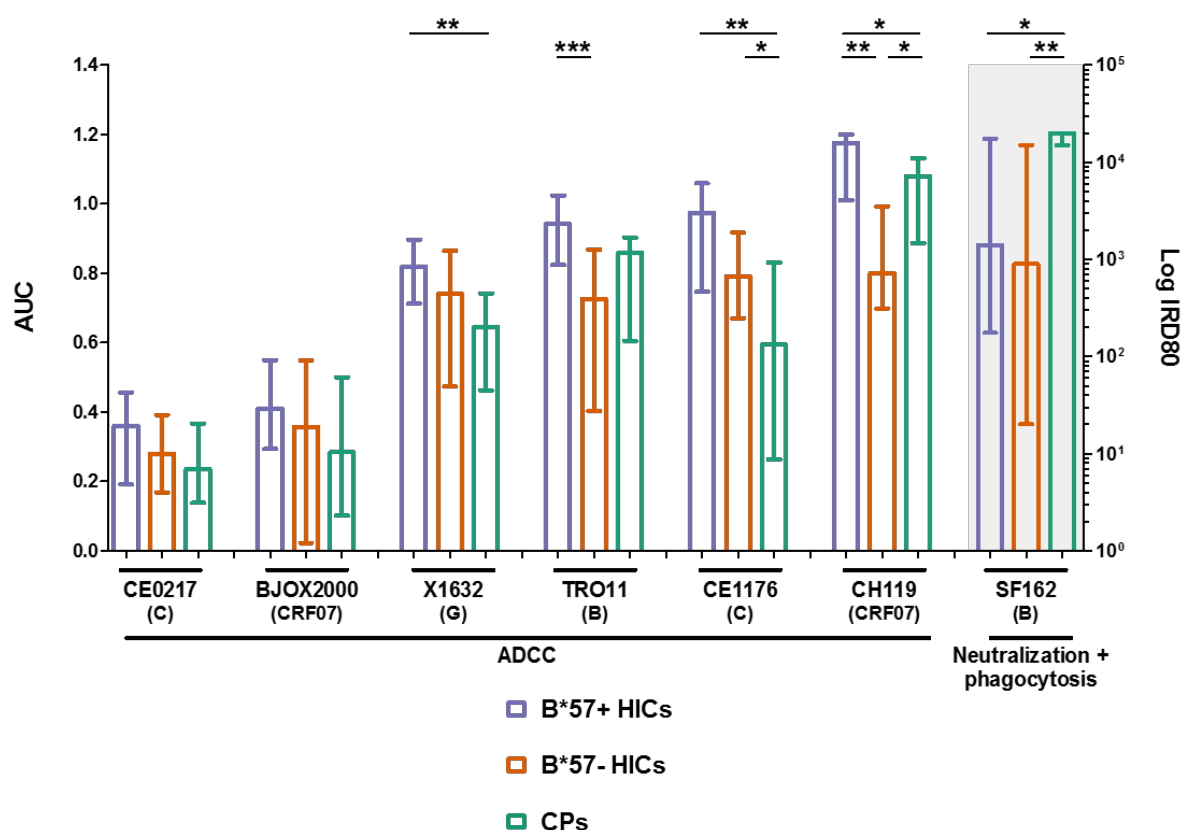


Fig 3. B*57+ HICs have stronger ADCC activities than B*57- HICs and CPs.

Sera from HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, n = 17), HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, n = 19) and chronic progressors (CPs, n = 16) were tested against 6 HIV-1 strains for ADCC and 1 HIV-1 strain for neutralization + phagocytosis activities. The median ADCC areas under the curve (AUCs) with interquartile ranges are represented on the left axis and the median neutralization + phagocytosis inhibitory reciprocal dilutions 80 % (IRD80s) with interquartile ranges are represented on the right axis (Log 10) for B*57+ HICs (purple), B*57- HICs (orange) and CPs (green). The statistical significances calculated using a Mann-Whitney test are represented (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

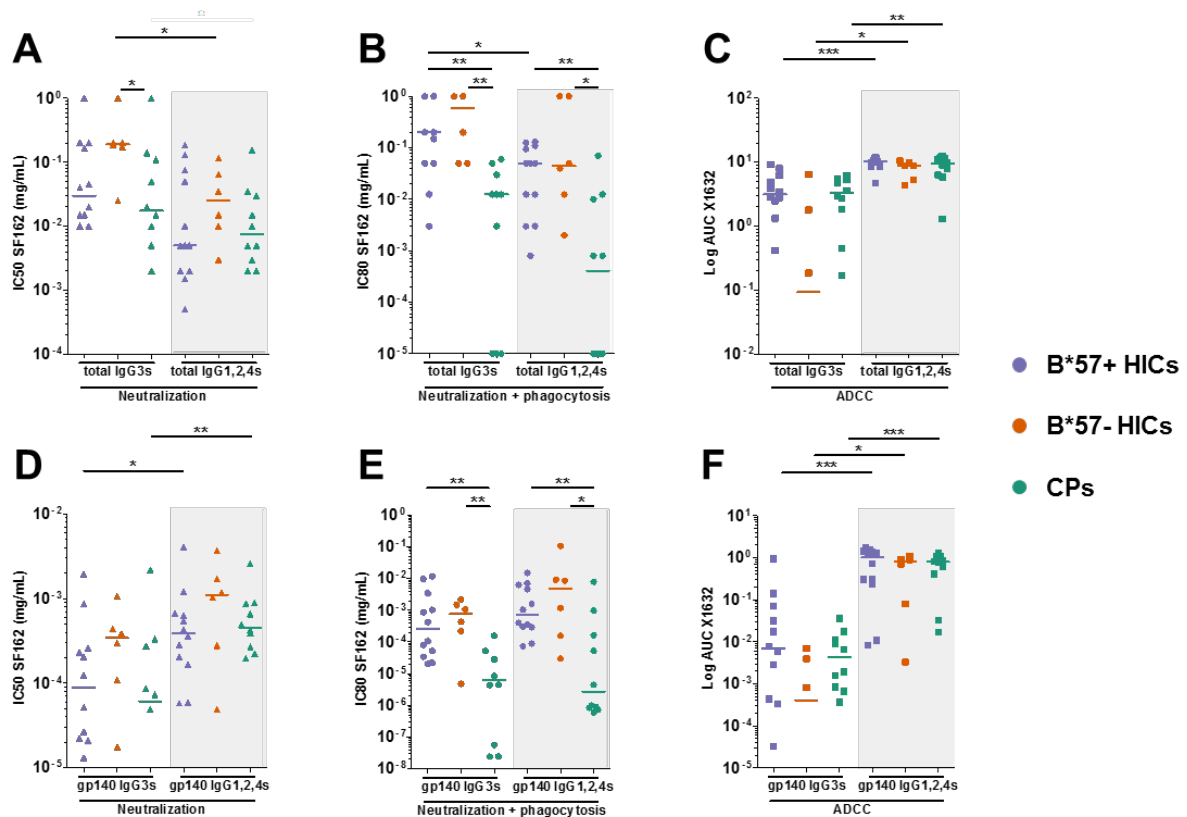


Fig 4. Increased neutralization and decreased ADCC of HIV-specific IgG3s compared to IgG1,2,4s.

The activities of purified IgG3s (left panel, white) and IgG1,2,4s (right panel, grey) from HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, n = 12, purple), HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, n = 6, orange) and chronic progressors (CPs, n = 10, green) are represented: (A) The neutralization inhibitory concentrations 50 % (IC50s) against SF162 (Log 10), (B) The neutralization + phagocytosis inhibitory concentrations 80 % (IC80s) against SF162 (Log 10) and (C) The ADCC areas under the curve (AUCs) against X1632 (Log 10). (D, E, F) Inhibitory activities corresponding to the HIV-specific IgG3s and IgG1,2,4s. The results for the total IgG3s and IgG1,2,4s from (A, B, C) respectively were multiplied by the anti-gp140 IgG or IgG3 ELISA OD ratios determined in Fig 1. The statistical significances calculated using a Mann-Whitney test are represented (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). The horizontal bars represent the median value for each patient group.

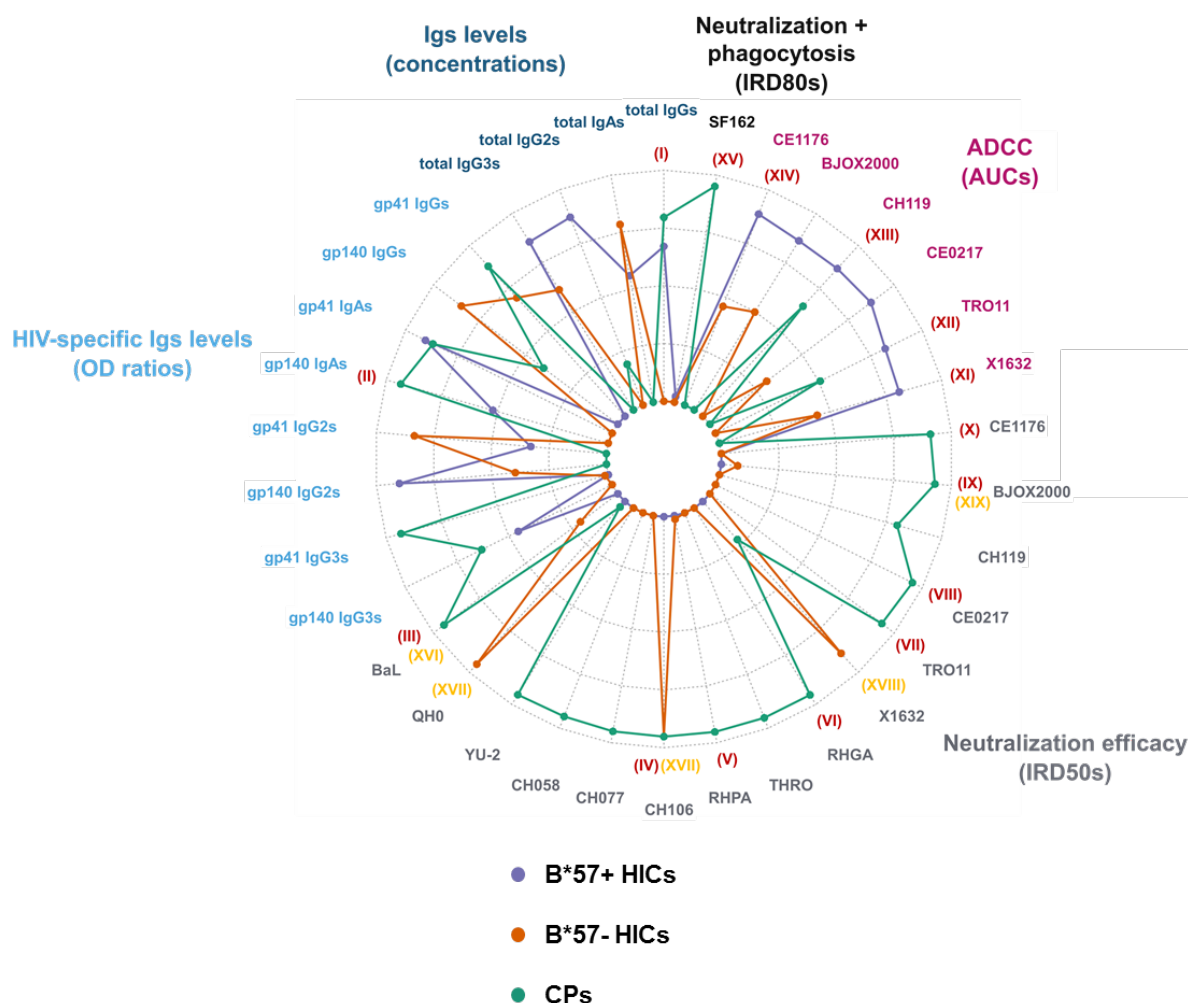


Fig 5. Ab profiles from individuals controlling HIV are distinct from CPs.

This radar plot illustrates the median Ig isotype levels (concentrations, dark blue), the median HIV-specific Ig isotype levels (OD ratios, light blue), the median neutralization inhibitory reciprocal dilutions (IRD50s) against 18 HIV-1 strains (grey), the median ADCC areas under the curve (AUCs) against 6 HIV-1 strains (pink) and the median neutralization + phagocytosis IRD80s against 1 HIV-1 strain (black) for B*57+ HICs (purple), B*57- HICs (orange) and chronic progressors (CPs, green). The red Roman numerals (I to XV) indicate the statistically different median values. The yellow Roman numerals (XVI to XIX) indicate non-statistical high median values in B*57- HICs.

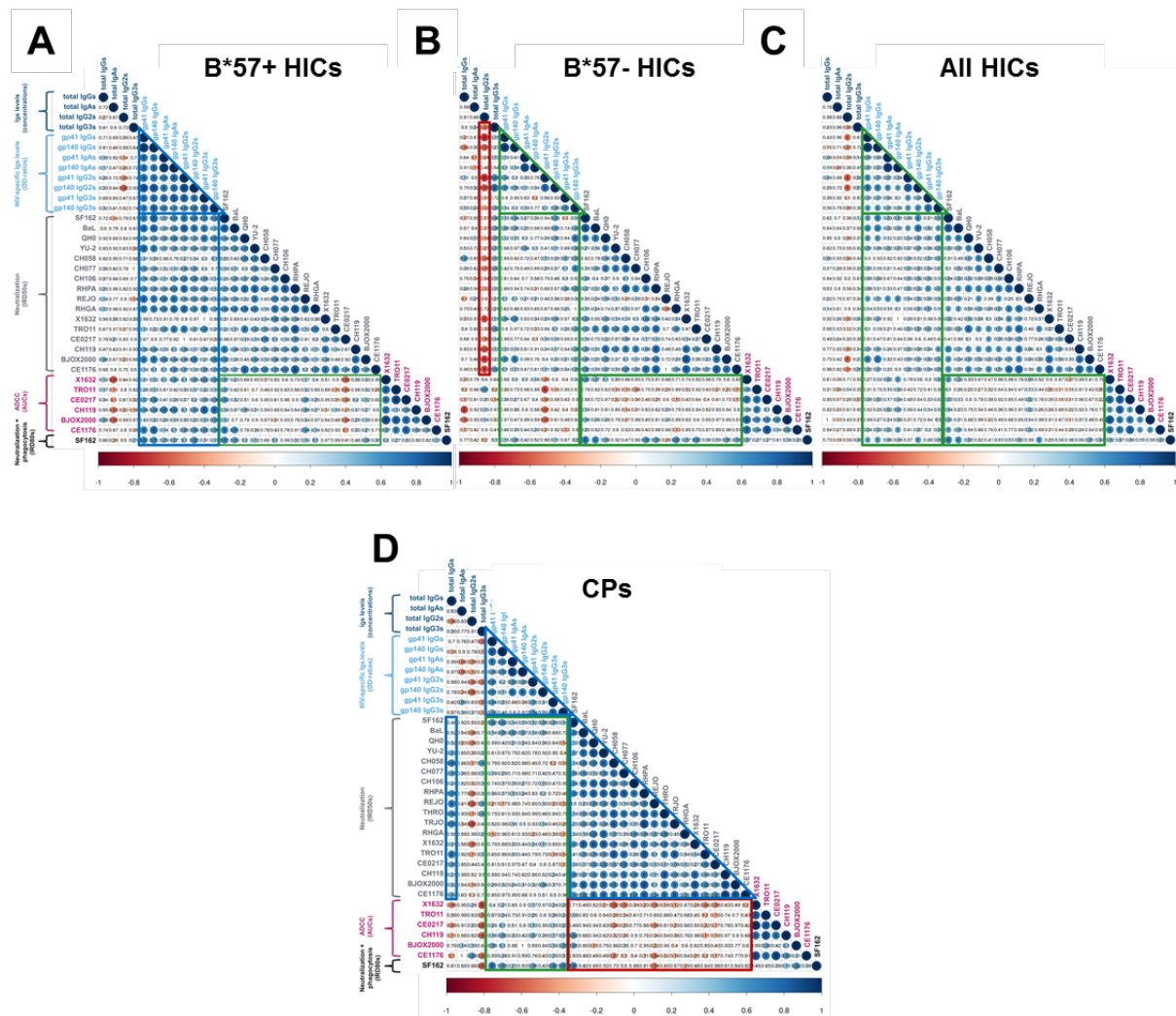
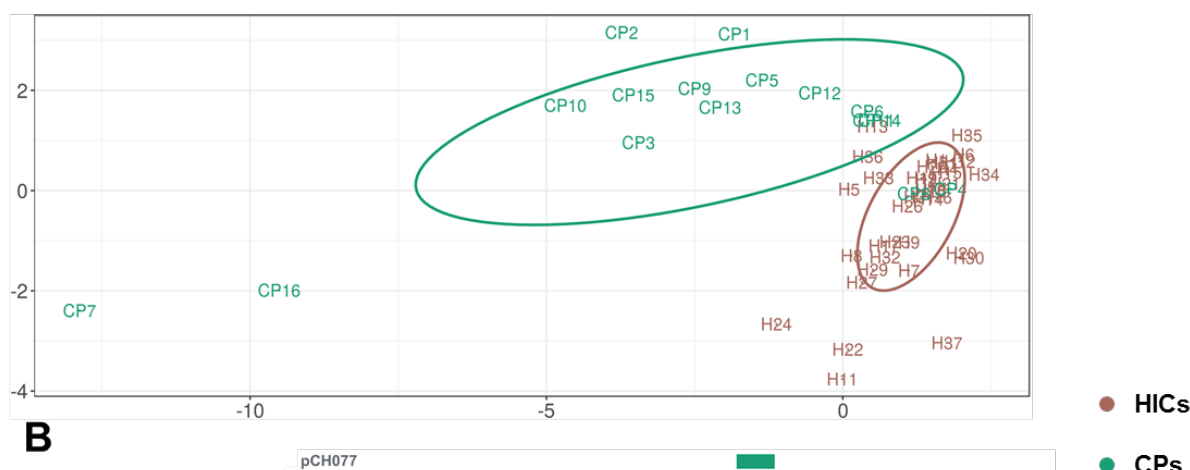


Fig 6. Induction of HIV-specific Ab isotypes correlates with functional activities in B*57+ HICs.

Spearman correlation matrices between the concentrations of various total Ig isotypes (dark blue), the levels of various HIV-specific Ig isotypes (OD ratios, light blue), the neutralization efficacy (IRD50s, grey) against 18 HIV-1 strains, the ADCC activity (AUCs, pink) against 6 HIV-1 strains and the neutralization + phagocytosis activity (IRD80s, black) against 1 HIV-1 strain for (A) HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs), (B) HLA-B*57- HICs (B*57- HICs), (C) all HICs and (D) chronic progressors (CPs). Strength and significance are represented as size and color intensity: blue for positive correlation and red for negative correlation. p-values are indicated in the matrices.

A



B

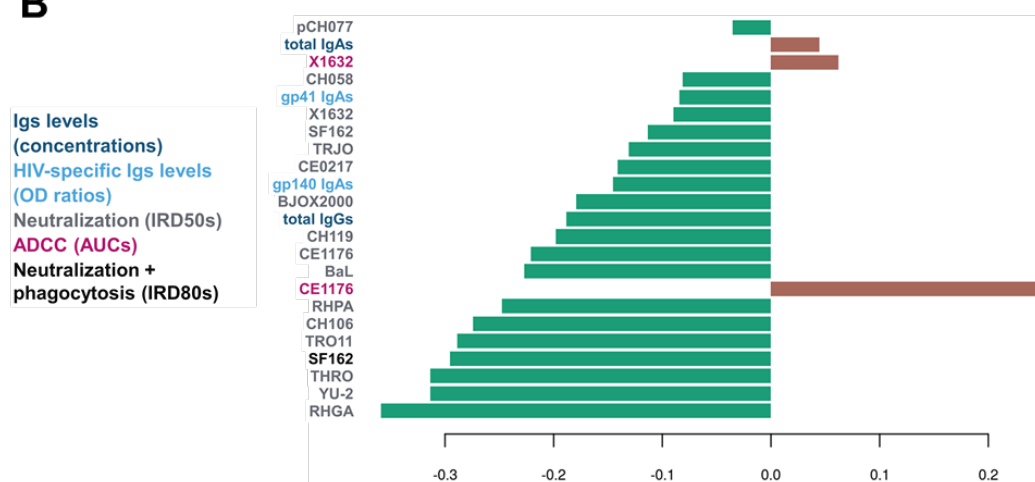


Fig 7. Neutralization as main discriminate between HICs and CPs.

(A) Illustration of the separation between HICs (red) and chronic progressors (CPs, green) based on their Ab characteristics. The ellipses correspond to the estimated 95 % confidence intervals. (B) The variable importance in the projection plots (A) corresponding to the relative importance (longer bar: more important) of selected features: levels of Ig isotypes (concentrations, dark blue), levels of HIV-specific Ig isotypes (OD ratios, light blue), the neutralization efficacy (IRD50s, grey) against HIV-1 strains, the ADCC activity against HIV-1 strains (AUCs, pink) and the neutralization + phagocytosis against 1 HIV-1 strain (IRD80s, black). The colors of the bars correspond to the group (HICs, red/chronic progressors, green) the feature is higher in.

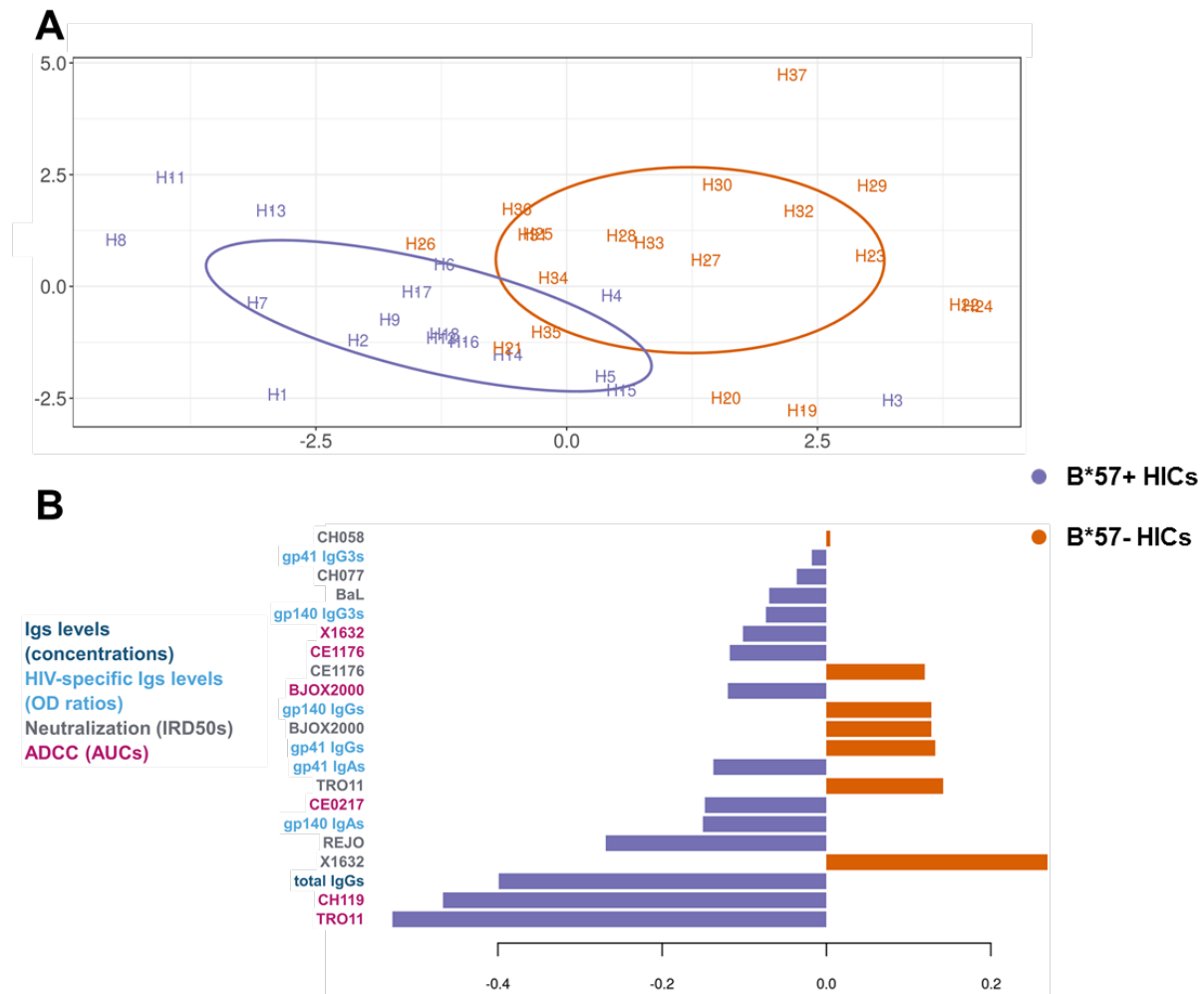
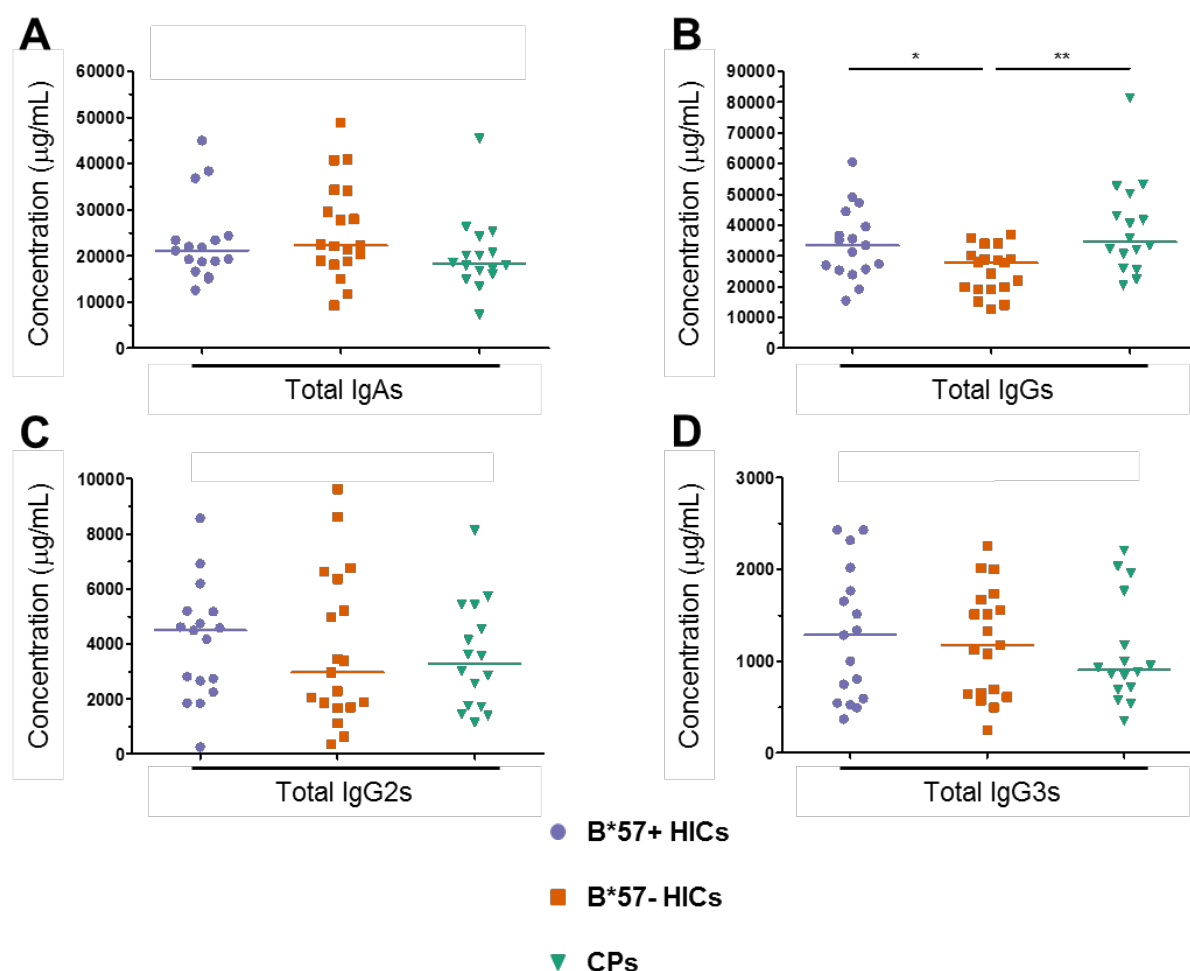


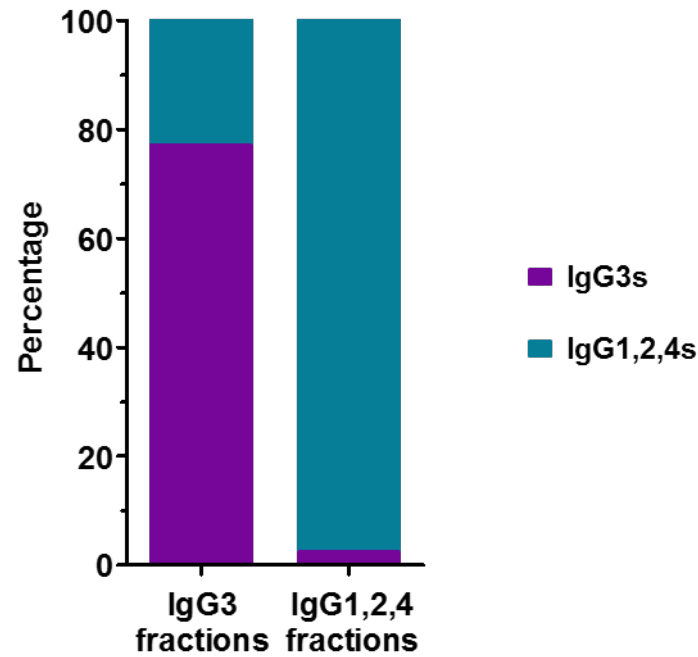
Fig 8. ADCC as main discriminate between B*57+ HICs and B*57- HICs.

(A) Illustration of the separation between HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, purple) and HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, orange) based on their Ab characteristics. The ellipses correspond to the estimated 95 % confidence intervals. (B) The variable importance in the projection plots (A) corresponding to the relative importance (longer bar: more important) of selected features: levels of Ig isotypes (concentrations, dark blue), levels of HIV-specific Ig isotypes (OD ratios, light blue), the neutralization efficacy (IRD50s, grey) against HIV-1 strains and the ADCC activity against HIV-1 strains (AUCs, pink). The colors of the bars correspond to the group (B*57+ HICs, purple/B*57- HICs, orange) the feature is higher in.

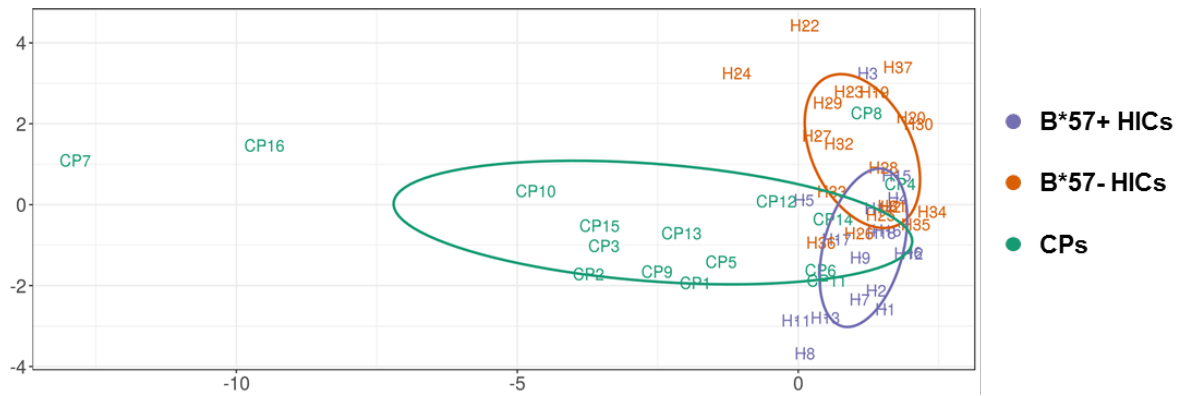
Supporting information



S1 Fig. Total Ig concentrations. Total (A) IgA, (B) IgG, (C) IgG2 and (D) IgG3 concentrations for HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, n = 17, purple circles), HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, n = 19, orange squares) and chronic progressors (CPs, n = 16, green triangles). The statistical significances calculated using a Mann-Whitney test are indicated (*: p < 0.05, **: p < 0.01). The horizontal bars represent the median of OD ratios for each patient group.



S2 Fig. Percentage of IgG3s and IgG1,2,4s in purified IgG3 fractions and IgG1,2,4 residual fractions. The mean percentages of IgG3s (purple) and IgG1,2,4s (blue) detected in purified IgG3 fractions (left) and the remaining purified IgG1,2,4 fractions (right) from 28 patients (HLA-B*57+ HICs (n = 12), HLA-B*57- HICs (n = 6) and chronic progressors (n = 10)) are represented.



S3 Fig. The Ab profile discriminates B*57+ HICs, B*57- HICs and CPs. Illustration of separation between HLA-B*57+ HICs (B*57+ HICs, purple), HLA-B*57- HICs (B*57- HICs, orange) and chronic progressors (CPs, green). The ellipses correspond to the estimated 95 % confidence intervals.

Conclusions et perspectives

Lymphocytes T CD4 ⁺	Lymphocytes T CD8 ⁺	Références
Expression TCR haute affinité → capacités cytotoxiques		(Benati et al. 2016; Galperin et al. 2018)
LTfh spécifiques du VIH préservés et associés à la fréquence des LB mémoires spécifiques de Env		(Buranapraditkun et al. 2017)
Fréquence LTfh circulants > patients traités et corrélée à plus forte production d'anticorps spécifiques du VIH dans des co-cultures avec des LB		(Claireaux et al. 2018)
	Puissantes réponses CD8 ⁺ cytotoxiques, souvent associées à l'expression de l'allèle HLA-B*57 ou B*27	(Sáez-Cirión and Manel 2018)

Tableau 5 : Récapitulatif des études sur l'implication de la réponse cellulaire adaptative chez les patients HIC.

La référence et les résultats de la publication à laquelle j'ai contribué sont indiqués en gras.

HLA : *human leukocyte antigen*, LB : lymphocytes B, LTfh : *follicular helper T cells*, TCR : récepteurs aux lymphocytes T.

Conclusions et perspectives

Cohortes		Lymphocytes B	Sous-type d'IgG	Neutralisation	Activités médiées par le domaine Fc	Références
HIC	Tous HIC	Proportions LB mémoires préservées				(Pensieroso et al. 2013; Rouers, Klingler, et al. 2017)
		Proportions LB mémoires spécifiques du VIH > patients traités				(Buckner et al. 2016; Rouers, Klingler, et al. 2017)
			Anticorps anti-VIH < chroniques	Neutralisation < chroniques		(Bailey et al. 2006)
				Neutralisations hétérogènes		(Pereyra et al. 2008; Lambotte et al. 2009; Sajadi et al. 2011) Klingler et al. en préparation
			IgG1 anti-p24 > chroniques			(Banerjee et al. 2010)
					ADCC > chroniques	(Lambotte et al. 2009) Klingler et al. en préparation
			IgG1 et IgG3 enrichies	Neutralisation corrélé aux activités Fc	ADCC, ADCD, ADCP, et activation NK corrélés à neutralisation	(Ackerman et al. 2016)
			IgG1 anti-gp120 HIC avec activités neutralisantes > HIC non neutralisants		ADCC et ADCP HIC avec activités neutralisantes > HIC non neutralisants (ADCC =)	(Lofano et al. 2018)
			IgG2 < et IgG3 > chroniques			(Sadanand et al. 2018)
			Profil d'anticorps distingue patients HIC, HIC-HLA-B*57+, HIC HLA-B*57- et chroniques			Klingler et al. en préparation

Conclusions et perspectives

	HIC HLA- B*57+	Fréquence LB mémoires spécifiques du VIH corrélée aux activités neutralisantes		Activités hétérogènes		(Rouers, Klingler, et al. 2017)
				Neutralisation large chez un patient		(Freund et al. 2017)
			IgG, IgA, IgG2 et IgG3 anti- gp41 et anti-gp140 = chroniques	Activités < chroniques	ADCC > chroniques et HIC HLA-B*57- Phagocytose < chroniques	Klingler et al. en préparation
	HIC HLA- B*57-		IgG2 anti-gp41 > HIC HLA- B*57+ et chroniques			(French et al. 2013)
					ADCC > HIC HLA-B*57+	(Lambotte et al. 2013)
			IgG, IgA, IgG2 et IgG3 anti- gp41 et anti-gp140 = chroniques	Activités > chroniques sur certaines souches	ADCC > chroniques Phagocytose < chroniques	Klingler et al. en préparation
LTNP				Neutralisation > chroniques		(Cao et al. 1995; Pantaleo et al. 1995; Montefiori et al. 1996; Pilgrim et al. 1997)
			IgG2 anti-gp41 > chroniques			(Ngo-Giang-Huong et al. 2001)

Tableau 6 : Récapitulatif des études sur l'implication de la réponse anticorps chez les patients HIC et LTNP.

Les références et les résultats des publications auxquelles j'ai contribué sont indiqués en gras.

ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCD : *antibody-dependent complement deposition*, ADCP : *antibody-dependent cellular phagocytosis*, HLA : *human leukocyte antigen*, Ig : *immunoglobuline*, LB : *lymphocytes B*.

Conclusions et perspectives

Mon projet de thèse a visé à effectuer une analyse fine et détaillée du profil d'anticorps induit dans une large cohorte de patients HIC (40 patients) et de comparer ces caractéristiques à celles de patients chroniques, progressant vers la maladie. Ainsi, j'ai étudié, en parallèle, la réponse B spécifique du VIH, les réponses isotypes et sous-types d'immunoglobulines totales et spécifiques du VIH, les activités de neutralisation (dépendantes du domaine Fab) et les activités inhibitrices médiées par le domaine Fc des anticorps (lyse cellulaire et phagocytose). Cette étude large et complète m'a permis de mettre en évidence des interactions et des associations entre les différents paramètres des anticorps et de dégager une vision globale de la réponse anticorps chez les HIC.

L'accès à 40 prélèvements de patients HIC définis de manière stricte (plus de cinq ans de contrôle de la charge virale), la séparation de ces patients en fonction de leur statut HLA-B*57 et l'utilisation de nouveaux protocoles expérimentaux physiologiquement relevant sont autant de garants de la pertinence des résultats obtenus. Le profil distinct obtenu selon le statut HLA-B*57 permet en partie, d'expliquer la dichotomie de certains résultats précédemment publiés sur la réponse anticorps développée chez les patients contrôleurs.

Ainsi, bien que l'étude des caractéristiques des anticorps des patients HIC ait été déjà abordée précédemment, notre étude permet de proposer une vision nouvelle et affinée du rôle des anticorps par la définition et la quantité des échantillons analysés, la diversité et la pertinence des tests réalisés et l'analyse récapitulative des associations et des interactions de ces différents paramètres. Il s'agit de la première étude permettant d'obtenir une vision complète des spécificités de la réponse anticorps associée au contrôle du VIH.

Premièrement, nous avons montré que des interactions clés entre les lymphocytes cTfh et les lymphocytes B sont préservées chez les patients contrôleurs. De fait, la fréquence des lymphocytes Tfh circulants spécifiques du VIH était supérieure chez les patients HIC par rapport à des patients traités et était corrélée à une plus forte production d'anticorps dans des co-cultures de lymphocytes B et de lymphocytes Tfh circulants (Claireaux et al. 2018). Ces interactions permettent d'expliquer le maintien de réponses lymphocytes B mémoires observé chez les HIC et suggèrent un rôle encore sous-estimé de cette réponse dans le contrôle de l'infection par le VIH (Rouers, Klingler, et al. 2017; Claireaux et al. 2018). Cette préservation des lymphocytes Tfh associée à la fréquence élevée de lymphocytes B mémoires spécifiques de Env a été observée précédemment (Buranapraditkun et al. 2017). La

préservation des fonctions lymphocytes Tfh chez les HIC, sauvegardant ainsi les interactions lymphocytes B/lymphocytes Tfh, permettrait de maintenir la production et la maturation des anticorps spécifiques du VIH chez les HIC.

De manière remarquable, nous observons que la fréquence des lymphocytes B mémoires spécifiques du VIH est corrélée positivement avec les titres neutralisants chez les HIC possédant l'allèle HLA-B*57 (mais pas chez les HIC HLA-B*57-), ce qui suggère que la préservation des lymphocytes B mémoires spécifiques du VIH dans le contexte d'une réponse T forte et adaptée grâce à cet allèle HLA favorable pourrait contribuer aux réponses neutralisantes chez ce sous-groupe de patients (Rouers, Klingler, et al. 2017).

La préservation de la réponse B pourrait expliquer le maintien des concentrations fortes d'anticorps spécifiques du VIH. En effet, nous n'observons pas de différences entre les niveaux des isotypes et sous-types d'immunoglobulines totales et spécifiques du VIH entre les différents groupes de patients. Ainsi, les patients HIC ont maintenu une réponse anticorps spécifique similaire à celle observée chez les patients chroniques, et ceci, malgré une charge virale indétectable depuis plus de cinq ans.

De précédentes études ayant analysé les isotypes spécifiques du VIH chez les HIC avaient montré des résultats contradictoires, avec dans certaines études, des taux plus élevés d'IgG anti-Env et anti-Vpu (Madhavi et al. 2017) chez les HIC ou une perte d'IgG3 spécifiques du VIH au cours de la progression (Sadanand et al. 2018), alors que d'autres ont montré des niveaux inférieurs d'IgG et d'IgG1 spécifiques du VIH chez les HIC par rapport à des patients contrôleurs virémiques (charge virale < 2000 copies/mL) et à des patients non contrôleurs (Ackerman et al. 2016). De plus, les IgG2 anti-VIH étaient associées à une non-progression à long terme (Ngo-Giang-Huong et al. 2001; Martinez et al. 2005), en particulier dans le sous-groupe des patients HIC HLA-B*57- (French et al. 2013). Dans notre étude, seule une diminution significative de la réponse en IgG totales et une diminution non significative des IgG2 spécifiques du VIH dans le sous-groupe des patients HIC HLA-B*57- ont été observées. De plus, les HIC HLA-B*57- ont montré des taux significativement plus bas d'IgA anti-gp140. Les études précédentes, analysant les réponses IgA spécifiques du VIH chez les HIC ont montré des résultats contradictoires avec des niveaux similaires ou supérieurs chez les HIC par rapport à des individus virémiques (Ruiz et al. 2015; Nabi et al. 2017). Ces études ne faisaient cependant pas de distinction entre les HIC HLA-B*57+ et les HIC HLA-B*57-.

Conclusions et perspectives

Il serait intéressant d'étendre cette étude des réponses anticorps chez les HIC aux IgM et aux anticorps présents dans les autres compartiments comme les tissus des muqueuses. En effet, une étude récente a montré que les IgM spécifiques du VIH pouvaient prévenir la transmission de virus chimérique SHIV au niveau des muqueuses dans un modèle de macaques infectés expérimentalement (Gong et al. 2018).

La disparité des résultats concernant les isotopes spécifiques du VIH induits après une infection pourrait être attribuée aux différences de protocoles et notamment à l'antigène (épitope) utilisé pour détecter les anticorps spécifiques du VIH. En effet, la détection des anticorps varie en fonction du type d'enveloppe (monomérique ou trimérique) et des séquences utilisées dans le test de détection. Dans notre étude, nous avons utilisé une enveloppe trimérique qui a servi de base à l'isolement de nombreux anticorps monoclonaux. Les résultats variables observés pourraient également être dus aux caractéristiques des groupes de patients HIC et chroniques utilisés. Dans notre étude, la cohorte HIC correspond à des patients contrôlant la virémie (< 50 copies/mL) depuis plus de cinq ans. Cette cohorte de HIC a été comparée à un groupe historique de patients chroniques pour lesquels les échantillons ont été prélevés avant la diminution de leurs niveaux de lymphocytes T CD4⁺. Ceci implique que les sérums ont été recueillis avant une immunosuppression profonde résultant de la multiplication virale. Globalement, l'absence de diminution substantielle des anticorps spécifiques du VIH chez les HIC suggère fortement que la réponse globale des anticorps spécifiques du VIH subsiste chez ces patients pendant une longue période, malgré la disparition de l'antigène dans le sang et/ou que de faibles nombres de réservoirs viraux suffisent pour maintenir une réponse B soutenue, capables de générer des plasmocytes producteurs d'IgG et d'IgA.

En ce qui concerne les réponses anticorps fonctionnelles, nous avons d'abord analysé les activités de neutralisation. Nous avons constaté que les HIC possèdent des anticorps à activités neutralisantes hétérogènes, avec certains patients ayant des niveaux d'anticorps neutralisants similaires à ceux observés chez les patients chroniques. Il est important de noter que nous avons utilisé 15 pseudovirus construits avec des enveloppes de virus tier-2 et transmis/fondateurs récemment isolées, démontrant ainsi que l'activité de neutralisation croisée détectée chez certains de nos patients HIC est dirigée contre des souches pertinentes, difficiles à neutraliser, circulant chez des individus infectés.

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

Dans des études antérieures, des résultats similaires, c'est-à-dire des activités de neutralisation très larges dans un sous-ensemble (environ 10 %) étaient décrites chez des HIC (Bailey et al. 2006; Pereyra et al. 2008; Lambotte et al. 2009; Sajadi et al. 2011; González et al. 2018; Dugast et al. 2017). Nous avons constaté que le profil neutralisant global chez les patients HIC était néanmoins inférieur à celui observé dans notre groupe de patients chroniques. Cette activité élevée de neutralisation dans les patients chroniques est en accord avec des résultats précédents, associant la puissance de neutralisation au nombre de quasi-espèces virales circulantes (Pernas et al. 2015; Rusert et al. 2016). La réponse neutralisante large serait en effet favorisée par la présence de nombreuses souches virales échappant à la réponse humorale induite. Cet échappement continu permettrait de sélectionner les lymphocytes B spécifiquement dirigés contre les épitopes conservés (Sather et al. 2009; Mikell et al. 2011; Rusert et al. 2016; Dugast et al. 2017). La raison de l'induction d'anticorps neutralisants à large spectre chez certains HIC en absence de charge virale élevée n'est pas encore expliquée. Les lymphocytes B produisant des anticorps neutralisants larges pourraient être sélectionnés par hasard, sans nécessité de sélection suite à une maturation prolongée (Freund et al. 2017). Par exemple, l'induction du sous-type IgG3 spécifique du VIH, pour lequel nous observons une activité neutralisante efficace dans cette étude chez les HIC, pourrait être le résultat d'une sélection précoce au cours de la maturation des anticorps, favorisant la destruction et le contrôle du virus. D'autres proposent un profil inflammatoire unique associé à une évolution favorable de la réponse neutralisante (Dugast et al. 2017).

Il est intéressant de noter que nous observons plus d'anticorps neutralisants à large spectre chez les HIC HLA-B*57-, ce qui suggère que ces anticorps pourraient participer activement au contrôle précoce du VIH chez les patients négatifs pour l'allèle protecteur HLA-B*57. Au contraire, nous constatons que les patients HIC HLA-B*57+ présentent une forte corrélation entre la neutralisation et la quantité d'anticorps spécifiques au VIH détectés dans les sérums. Or, nous avons également montré, en collaboration avec le laboratoire d'A. Moris (CIMI, Paris), que les proportions des lymphocytes B mémoires des HIC étaient préservées et que ces patients présentaient de fortes réponses lymphocytes B mémoires spécifiques du VIH, associées aux capacités de neutralisation chez les patients HIC HLA-B*57+ (Rouers, Klingler, et al. 2017). Comme les HIC présentent un contrôle rapide de la réplication virale (Goujard et al. 2009), probablement médié par une forte réponse lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques chez les patients HIC HLA-B*57+ (Sáez-Cirión et al. 2007), il se pourrait que la suppression de virus par

Conclusions et perspectives

la réponse CD8⁺ cytotoxique efficace permette l'établissement de réponses lymphocytes B mémoires à minima, avec la production d'anticorps neutralisants, sans pour autant induire une réponse large et mature puisque la réplication virale reste circonscrite par la réponse T efficace. Cette limitation de la diversification des quasiespèces virales grâce à une réponse T efficace permettrait de limiter la diversification des anticorps produits, pour lesquels le maintien de la fonction neutralisante serait associé à la réponse B. De plus, la préservation des réponses lymphocytes B pourrait générer la production d'anticorps démontrant des fonctions inhibitrices distinctes de la neutralisation.

Effectivement, nous démontrons de fortes activités médiées par le domaine Fc chez les patients contrôleurs (notamment de fortes activités ADCC chez les patients HIC HLA-B*57+). Cette participation des activités non neutralisantes médiées par le domaine Fc des anticorps au contrôle de la réplication du VIH a été proposée précédemment (Forthal, Landucci, and Daar 2001; Florese et al. 2006, 2009; Horwitz et al. 2017). Elle est confirmée dans notre étude avec des tests fonctionnels d'analyse de la lyse des cellules infectées.

Une étude approfondie des mécanismes impliqués dans ces activités non neutralisantes devra être effectuée. En effet, ces fonctions dépendent de la liaison entre le domaine Fc des anticorps et les récepteurs Fc présents à la surface des cellules immunitaires. On pourrait ainsi émettre l'hypothèse qu'une expression accrue des récepteurs Fc à la surface des cellules des HIC par rapport aux patients chroniques participerait à l'activité inhibitrice des anticorps. Ainsi, l'analyse du génotypage et de l'expression des récepteurs Fc à la surface des cellules effectrices présentes dans les HIC permettrait de compléter cette étude sur le rôle des fonctions inhibitrices médiées par les anticorps. Une étude financée par l'ANRS est actuellement en cours au sein du laboratoire afin de répondre à cette question. Le génotypage des polymorphismes des différents récepteurs Fc de 230 patients HIC (incluant nos 40 patients pour lesquels la réponse anticorps a été caractérisée) en comparaison à 250 patients chroniques est en cours d'analyse. Cette étude permettra de compléter notre analyse sur les rôles respectifs des fonctions des anticorps dans le contrôle du VIH.

Afin de déterminer si un profil de maturation d'anticorps particulier pouvait expliquer les fortes activités fonctionnelles détectées dans les HIC, nous nous sommes focalisés sur les fonctions du sous-type IgG3. En effet, les IgG3 présentent de fortes affinités pour tous les

récepteurs Fcγ présents à la surface des cellules immunitaires (Gillis et al. 2014). De plus, ce sous-type a été associé à une diminution du risque d'infection dans l'essai vaccinal RV144 (Chung et al. 2014) et a été proposé comme étant essentiel pour la prévention de l'infection (Yates et al. 2014). Nous avons purifié les IgG3 à partir de sérums de patients HIC et de patients chroniques et analysé les fonctions inhibitrices dans ces fractions purifiées. Nous observons que les IgG3 spécifiques du VIH purifiées des sérums de patients HIC démontrent des activités neutralisantes plus fortes mais des activités ADCC plus faibles que celles des IgG1,2,4 restantes. Cependant, ces IgG3 spécifiques ne représentent qu'une petite fraction des IgG3 totales. La contribution de ce sous-type à la réponse anticorps fonctionnelle observée dans le sérum et son association avec le contrôle du VIH doivent faire l'objet d'études plus approfondies. En effet, l'induction d'anticorps monoclonaux de ce sous-type IgG3 pourrait être une voie intéressante à explorer dans le cadre du développement d'une thérapie vaccinale contre le VIH.

L'étude approfondie des différentes caractéristiques des anticorps des patients contrôleurs du VIH a permis de disséquer les interactions et les contributions relatives des différentes caractéristiques des anticorps. Nous observons des associations très distinctes entre les caractéristiques des patients HIC et chroniques et entre celles des patients HIC HLA-B*57+ et HIC HLA-B*57-. Ces associations sont certainement le résultat de maturations distinctes des anticorps dans ces différents groupes. De plus, ces groupes se distinguent par les fonctions inhibitrices de leurs anticorps. De manière générale, les patients chroniques ont des fonctions neutralisantes et de phagocytose plus élevées que les HIC alors que les fonctions ADCC sont en moyenne plus élevées chez les HIC. Dans le sous-groupe de patients HIC HLA-B*57+, les fonctions neutralisantes sont plus faibles et les fonctions ADCC plus fortes que chez les HIC HLA-B*57-.

Ainsi le profil des anticorps fonctionnels dans ces différents groupes permet, à lui seul, de discriminer les patients HIC des patients chroniques et les patients HIC HLA-B*57+ des patients HIC HLA-B*57-. Ces résultats soulignent le rôle central de ces anticorps inhibiteurs spécifiques du VIH dans le contrôle du VIH.

Une étude approfondie des épitopes ciblés par les anticorps induits chez les patients HIC en comparaison aux patients chroniques devra être menée afin de poursuivre la caractérisation

Conclusions et perspectives

des anticorps associés aux fonctions inhibitrices et au contrôle de la charge virale. En effets, les épitopes reconnus par les anticorps pourraient être différents selon que l'on cible une fonction neutralisante à large spectre ou une fonction ADCC (Stanfield-Oakley et al., n.d.). L'identification des épitopes ciblés par les anticorps induits chez les patients HIC permettrait le développement de nouvelles familles d'anticorps monoclonaux ayant un bénéfice potentiel pour le contrôle du VIH *in vivo*.

De façon générale, une meilleure connaissance des caractéristiques et isotypes de la réponse anticorps chez les patients contrôleurs guidera notre choix vers l'induction et l'utilisation de nouveaux protocoles vaccinaux et de traitements thérapeutiques.

Conclusions et perspectives

Bibliographie

Bibliographie

Bibliographie

A

- Ackerman, Margaret E., Anne-Sophie Dugast, Elizabeth G. McAndrew, Stephen Tsoukas, Anna F. Licht, Darrell J. Irvine, and Galit Alter. 2013. "Enhanced Phagocytic Activity of HIV-Specific Antibodies Correlates with Natural Production of Immunoglobulins with Skewed Affinity for FcγR2a and FcγR2b." *Journal of Virology* 87 (10): 5468–76. <https://doi.org/10.1128/JVI.03403-12>.
- Ackerman, Margaret E., Anastassia Mikhailova, Eric P. Brown, Karen G. Dowell, Bruce D. Walker, Chris Bailey-Kellogg, Todd J. Suscovich, and Galit Alter. 2016. "Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control." *PLoS Pathog* 12 (1): e1005315. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005315>.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. "CCR5: A RANTES, MIP-1α, MIP-1β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1." *Science (New York, N.Y.)* 272 (5270): 1955–58.
- Almeida, Jorge R., David A. Price, Laura Papagno, Zaïna Aït Arkoub, Delphine Sauce, Ethan Bornstein, Tedi E. Asher, et al. 2007. "Superior Control of HIV-1 Replication by CD8+ T Cells Is Reflected by Their Avidity, Polyfunctionality, and Clonal Turnover." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (10): 2473–85. <https://doi.org/10.1084/jem.20070784>.
- Almeida, Jorge R., Delphine Sauce, David A. Price, Laura Papagno, So Youn Shin, Arnaud Moris, Martin Larsen, et al. 2009. "Antigen Sensitivity Is a Major Determinant of CD8+ T-Cell Polyfunctionality and HIV-Suppressive Activity." *Blood* 113 (25): 6351–60. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206557>.
- Alter, Galit, and M. Anthony Moody. 2010. "The Humoral Response to HIV-1: New Insights, Renewed Focus." *The Journal of Infectious Diseases* 202 Suppl 2 (October): S315–322. <https://doi.org/10.1086/655654>.
- "ANRS - Santé Publique, Sciences Sociales - Actualités - L'essai ANRS Ipergay Montre Une Diminution de 86% Du Risque d'infection." n.d. Accessed June 23, 2016. <http://www.anrs.fr/VIH-SIDA/Sante-publique-Sciences-sociales/Actualites/L-essai-ANRS-Ipergay-montre-une-diminution-de-86-du-risque-d-infection>.
- Arhel, Nathalie. 2010. "Revisiting HIV-1 Uncoating." *Retrovirology* 7 (November): 96. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-96>.
- Avettand-Fènoël, Véronique, Laurent Hocqueloux, Jade Ghosn, Antoine Cheret, Pierre Frange, Adeline Melard, Jean-Paul Viard, and Christine Rouzioux. 2016. "Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications." *Clinical Microbiology Reviews* 29 (4): 859–80. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-16>.
- Avettand-Fenoel, Véronique, Thierry Prazuck, Laurent Hocqueloux, Adeline Melard, Christophe Michau, Rémy Kerdraon, Eric Agoute, and Christine Rouzioux. 2008. "HIV-DNA in Rectal Cells Is Well Correlated with HIV-DNA in Blood in Different Groups of Patients, Including Long-Term Non-Progressors." *AIDS (London, England)* 22 (14): 1880–82. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32830fbdbc>.
- Avrameas, Stratis, Therese Ternynck, Ioannis A. Tsonis, and Peggy Lymberi. 2007. "Naturally Occurring B-Cell Autoreactivity: A Critical Overview." *Journal of Autoimmunity* 29 (4): 213–18. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.07.010>.

B

- Baba, T. W., V. Liska, R. Hofmann-Lehmann, J. Vlasak, W. Xu, S. Ayehunie, L. A. Cavacini, et al. 2000. "Human Neutralizing Monoclonal Antibodies of the IgG1 Subtype Protect against

- Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection." *Nature Medicine* 6 (2): 200–206. <https://doi.org/10.1038/72309>.
- Bailey, Justin R., Kara G. Lassen, Hung-Chih Yang, Thomas C. Quinn, Stuart C. Ray, Joel N. Blankson, and Robert F. Siliciano. 2006. "Neutralizing Antibodies Do Not Mediate Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Elite Suppressors or Selection of Plasma Virus Variants in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy." *Journal of Virology* 80 (10): 4758–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4758-4770.2006>.
- Baltimore, D. 1970. "RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses." *Nature* 226 (5252): 1209–11.
- Banerjee, Kaustuv, P. J. Klasse, Rogier W. Sanders, Florencia Pereyra, Elizabeth Michael, Min Lu, Bruce D. Walker, and John P. Moore. 2010. "IgG Subclass Profiles in Infected HIV Type 1 Controllers and Chronic Progressors and in Uninfected Recipients of Env Vaccines." *AIDS Research and Human Retroviruses* 26 (4): 445–58. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0223>.
- Barbas, C. F., J. E. Crowe, D. Cababa, T. M. Jones, S. L. Zebedee, B. R. Murphy, R. M. Chanock, and D. R. Burton. 1992. "Human Monoclonal Fab Fragments Derived from a Combinatorial Library Bind to Respiratory Syncytial Virus F Glycoprotein and Neutralize Infectivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10164–68.
- Barin, Francis, and Martine Braibant. 2019. "HIV-1 Antibodies in Prevention of Transmission." *Current Opinion in HIV and AIDS*, April. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000553>.
- Barouch, Dan H., Galit Alter, Thomas Broge, Caitlyn Linde, Margaret E. Ackerman, Eric P. Brown, Erica N. Borducchi, et al. 2015. "Protective Efficacy of Adenovirus/Protein Vaccines against SIV Challenges in Rhesus Monkeys." *Science (New York, N.Y.)* 349 (6245): 320–24. <https://doi.org/10.1126/science.aab3886>.
- Barouch, Dan H., Kathryn E. Stephenson, Erica N. Borducchi, Kaitlin Smith, Kelly Stanley, Anna G. McNally, Jinyan Liu, et al. 2013. "Protective Efficacy of a Global HIV-1 Mosaic Vaccine against Heterologous SHIV Challenges in Rhesus Monkeys." *Cell* 155 (3): 531–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.061>.
- Barouch, Dan H., Frank L. Tomaka, Frank Wegmann, Daniel J. Stieh, Galit Alter, Merlin L. Robb, Nelson L. Michael, et al. 2018. "Evaluation of a Mosaic HIV-1 Vaccine in a Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1/2a Clinical Trial (APPROACH) and in Rhesus Monkeys (NHP 13-19)." *Lancet (London, England)* 392 (10143): 232–43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31364-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31364-3).
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., et al. 1983. "Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)." *Revista De Investigación Clínica; Organo Del Hospital De Enfermedades De La Nutrición* 56 (2): 126–29.
- Barré-Sinoussi, Françoise, Ross, Anna Laura and Delfraissy, Jean-François. 2013. "Past, Present and Future: 30 Years of HIV Research." *Nature Reviews. Microbiology* 11 (12): 877–83. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3132>.
- Barton, Kirston, Anni Winckelmann, and Sarah Palmer. 2016. "HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy." *Trends in Microbiology* 24 (5): 345–55. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.006>.

Bibliographie

- Bauby, Lopez-Vergès, and Berlioz-Torrent. 2008. "TIP47, Un Cofacteur Cellulaire Essentiel à l'incorporation Des Glycoprotéines d'enveloppe Du VIH-1 Dans La Particule Virale." *Virologie* 12 (3): 201–13. <https://doi.org/10.1684/vir.2008.0172>.
- Beer, Brigitte E., Gustavo F. Doncel, Fred C. Krebs, Robin J. Shattock, Patricia S. Fletcher, Robert W. Buckheit, Karen Watson, et al. 2006. "In Vitro Preclinical Testing of Nonoxynol-9 as Potential Anti-Human Immunodeficiency Virus Microbicide: A Retrospective Analysis of Results from Five Laboratories." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (2): 713–23. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.713-723.2006>.
- Bejarano, David Alejandro, Ke Peng, Vibor Laketa, Kathleen Börner, K. Laurence Jost, Bojana Lucic, Bärbel Glass, Marina Lusic, Barbara Müller, and Hans-Georg Kräusslich. 2019. "HIV-1 Nuclear Import in Macrophages Is Regulated by CPSF6-Capsid Interactions at the Nuclear Pore Complex." *ELife* 8 (January). <https://doi.org/10.7554/eLife.41800>.
- Bell, Neil M, and Andrew M L Lever. 2013. "HIV Gag Polyprotein: Processing and Early Viral Particle Assembly." *Trends in Microbiology* 21 (3): 136–44. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006>.
- Benati, Daniela, Moran Galperin, Olivier Lambotte, Stéphanie Gras, Annick Lim, Madhura Mukhopadhyay, Alexandre Nouël, et al. 2016. "Public T Cell Receptors Confer High-Avidity CD4 Responses to HIV Controllers." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (6): 2093–2108. <https://doi.org/10.1172/JCI83792>.
- Bernstein, Helene B., Guangwu Wang, Mary C. Plasterer, Jerome A. Zack, Parthasarathy Ramasastry, Shannon M. Mumenthaler, and Christina M. R. Kitchen. 2009. "CD4+ NK Cells Can Be Productively Infected with HIV, Leading to Downregulation of CD4 Expression and Changes in Function." *Virology* 387 (1): 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.044>.
- Berry, Charles, Sridhar Hannenhalli, Jeremy Leipzig, and Frederic D. Bushman. 2006. "Selection of Target Sites for Mobile DNA Integration in the Human Genome." *PLoS Computational Biology* 2 (11): e157. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020157>.
- Betts, Michael R., Martha C. Nason, Sadie M. West, Stephen C. De Rosa, Stephen A. Migueles, Jonathan Abraham, Michael M. Lederman, et al. 2006. "HIV Nonprogressors Preferentially Maintain Highly Functional HIV-Specific CD8+ T Cells." *Blood* 107 (12): 4781–89. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4818>.
- Binley, James M., Elizabeth A. Lybarger, Emma T. Crooks, Michael S. Seaman, Elin Gray, Katie L. Davis, Julie M. Decker, et al. 2008. "Profiling the Specificity of Neutralizing Antibodies in a Large Panel of Plasmas from Patients Chronically Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes B and C." *Journal of Virology* 82 (23): 11651–68. <https://doi.org/10.1128/JVI.01762-08>.
- Blue, Clare E., O. Brad Spiller, and David J. Blackbourn. 2004. "The Relevance of Complement to Virus Biology." *Virology* 319 (2): 176–84.
- Blumenthal, Robert, Stewart Durell, and Mathias Viard. 2012. "HIV Entry and Envelope Glycoprotein-Mediated Fusion." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (49): 40841–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406272>.
- Boutet, A., H. Salim, Y. Taoufik, P. M. Lledo, J. D. Vincent, J. F. Delfraissy, and M. Tardieu. 2001. "Isolated Human Astrocytes Are Not Susceptible to Infection by M- and T-Tropic HIV-1 Strains despite Functional Expression of the Chemokine Receptors CCR5 and CXCR4." *Glia* 34 (3): 165–77.

- Briggs, John A G, and Hans-Georg Kräusslich. 2011. "The Molecular Architecture of HIV." *Journal of Molecular Biology* 410 (4): 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.021>.
- Buckner, Clarisa M., Lela Kardava, Xiaozhen Zhang, Kathleen Gittens, J. Shawn Justement, Colin Kovacs, Adrian B. McDermott, et al. 2016. "Maintenance of HIV-Specific Memory B-Cell Responses in Elite Controllers Despite Low Viral Burdens." *The Journal of Infectious Diseases*, April. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw163>.
- Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley, and M. Stevenson. 1993. "Association of Integrase, Matrix, and Reverse Transcriptase Antigens of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Viral Nucleic Acids Following Acute Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13): 6125–29.
- Buranapraditkun, Supranee, Franco Pissani, Jeffrey E. Teigler, Bruce T. Schultz, Galit Alter, Mary Marovich, Merlin L. Robb, et al. 2017. "Preservation of Peripheral T Follicular Helper Cell Function in HIV Controllers." *Journal of Virology* 91 (14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00497-17>.
- Burton. 2002. "Antibodies, Viruses and Vaccines." *Nature Reviews. Immunology* 2 (9): 706–13. <https://doi.org/10.1038/nri891>.
- Burton, and Lars Hangartner. 2016. "Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design." *Annual Review of Immunology* 34 (May): 635–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055515>.
- Burton, J. Pyati, R. Koduri, S. J. Sharp, G. B. Thornton, P. W. Parren, L. S. Sawyer, R. M. Hendry, N. Dunlop, and P. L. Nara. 1994. "Efficient Neutralization of Primary Isolates of HIV-1 by a Recombinant Human Monoclonal Antibody." *Science (New York, N.Y.)* 266 (5187): 1024–27.
- C**
- Campbell, R. S., and W. F. Robinson. 1998. "The Comparative Pathology of the Lentiviruses." *Journal of Comparative Pathology* 119 (4): 333–95.
- Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrit, and D. D. Ho. 1995. "Virologic and Immunologic Characterization of Long-Term Survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection." *The New England Journal of Medicine* 332 (4): 201–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199501263320401>.
- Cavacini, Lisa A., David Kuhrt, Mark Duval, Kenneth Mayer, and Marshall R. Posner. 2003. "Binding and Neutralization Activity of Human IgG1 and IgG3 from Serum of HIV-Infected Individuals." *AIDS Research and Human Retroviruses* 19 (9): 785–92. <https://doi.org/10.1089/088922203769232584>.
- Charpentier, Charlotte, Tamara Nora, Olivier Tenaillon, François Clavel, and Allan J. Hance. 2006. "Extensive Recombination among Human Immunodeficiency Virus Type 1 Quasispecies Makes an Important Contribution to Viral Diversity in Individual Patients." *Journal of Virology* 80 (5): 2472–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2472-2482.2006>.
- Checkley, Mary Ann, Benjamin G. Luttge, and Eric O. Freed. 2011. "HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation." *Journal of Molecular Biology* 410 (4): 582–608. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.042>.
- Chen, Huabiao, Zaza M. Ndhlovu, Dongfang Liu, Lindsay C. Porter, Justin W. Fang, Sam Darko, Mark A. Brockman, et al. 2012. "TCR Clonotypes Modulate the Protective Effect of HLA

Bibliographie

- Class I Molecules in HIV-1 Infection." *Nature Immunology* 13 (7): 691–700. <https://doi.org/10.1038/ni.2342>.
- Chermann, J. C., F. Barré-Sinoussi, C. Dauguet, F. Brun-Vezinet, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. "Isolation of a New Retrovirus in a Patient at Risk for Acquired Immunodeficiency Syndrome." *Antibiotics and Chemotherapy* 32: 48–53.
- Chertova, Elena, Oleg Chertov, Lori V Coren, James D Roser, Charles M Trubey, Julian W Bess Jr, Raymond C Sowder 2nd, et al. 2006. "Proteomic and Biochemical Analysis of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Produced from Infected Monocyte-Derived Macrophages." *Journal of Virology* 80 (18): 9039–52.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, et al. 1996. "The Beta-Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates." *Cell* 85 (7): 1135–48.
- Chun, T. W., D. Engel, M. M. Berrey, T. Shea, L. Corey, and A. S. Fauci. 1998. "Early Establishment of a Pool of Latently Infected, Resting CD4(+) T Cells during Primary HIV-1 Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15): 8869–73.
- Chung, Amy W., Musie Ghebremichael, Hannah Robinson, Eric Brown, Ickwon Choi, Sophie Lane, Anne-Sophie Dugast, et al. 2014. "Polyfunctional Fc-Effector Profiles Mediated by IgG Subclass Selection Distinguish RV144 and VAX003 Vaccines." *Science Translational Medicine* 6 (228): 228ra38. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007736>.
- Chung, Amy W., Jenniffer M. Mabuka, Bongiwé Ndlovu, Anna Licht, Hannah Robinson, Yathisha Ramlakhan, Musie Ghebremichael, et al. 2018. "Viral Control in Chronic HIV-1 Subtype C Infection Is Associated with Enrichment of P24 IgG1 with Fc Effector Activity." *AIDS (London, England)* 32 (10): 1207–17. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001812>.
- Chung, Erik Rollman, Susanne Johansson, Stephen J. Kent, and Ivan Stratov. 2008. "The Utility of ADCC Responses in HIV Infection." *Current HIV Research* 6 (6): 515–19.
- Claireaux, M., M. Galperin, D. Benati, A. Nouël, M. Mukhopadhyay, J. Klingler, P. de Truchis, et al. 2018. "A High Frequency of HIV-Specific Circulating Follicular Helper T Cells Is Associated with Preserved Memory B Cell Responses in HIV Controllers." *MBio* 9 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00317-18>.
- Clavel, F, D Guétard, F Brun-Vézinet, S Chamaret, M A Rey, M O Santos-Ferreira, A G Laurent, C Dauguet, C Katlama, and C Rouzioux. 1986. "Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS." *Science (New York, N.Y.)* 233 (4761): 343–46.
- Coffin, John M., Stephen H. Hughes, and Harold E. Varmus, eds. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19376/>.
- Collier, Ann C., Robert W. Coombs, David A. Schoenfeld, Roland L. Bassett, Joseph Timpone, Alice Baruch, Michelle Jones, et al. 1996. "Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection with Saquinavir, Zidovudine, and Zalcitabine." *New England Journal of Medicine* 334 (16): 1011–18. <https://doi.org/10.1056/NEJM199604183341602>.

D

- Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. "The CD4 (T4) Antigen Is an Essential Component of the Receptor for the AIDS Retrovirus." *Nature* 312 (5996): 763–67.

- Dalmaso, Cyril, Wassila Carpentier, Laurence Meyer, Christine Rouzioux, Cécile Goujard, Marie-Laure Chaix, Olivier Lambotte, et al. 2008. "Distinct Genetic Loci Control Plasma HIV-RNA and Cellular HIV-DNA Levels in HIV-1 Infection: The ANRS Genome Wide Association 01 Study." *PloS One* 3 (12): e3907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003907>.
- D'arc, Mirela, Ahidjo Ayouba, Amandine Esteban, Gerald H. Learn, Vanina Boué, Florian Liegeois, Lucie Etienne, et al. 2015. "Origin of the HIV-1 Group O Epidemic in Western Lowland Gorillas." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (11): E1343–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502022112>.
- De Leys, R., B. Vanderborcht, M. Vanden Haesevelde, L. Heyndrickx, A. Van Geel, C. Wauters, R. Bernaerts, E. Saman, P. Nijs, and B. Willems. 1990. "Isolation and Partial Characterization of an Unusual Human Immunodeficiency Retrovirus from Two Persons of West-Central African Origin." *Journal of Virology* 64 (3): 1207–1216.
- Deeks, Steven G., and Bruce D. Walker. 2007. "Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy." *Immunity* 27 (3): 406–16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010>.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, et al. 1996. "Identification of a Major Co-Receptor for Primary Isolates of HIV-1." *Nature* 381 (6584): 661–66. <https://doi.org/10.1038/381661a0>.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos. 1987. "Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System." *Molecular and Cellular Biology* 7 (1): 379–87. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.1.379>.
- Dugast, Anne-Sophie, Kelly Arnold, Giuseppe Lofano, Sarah Moore, Michelle Hoffner, Melissa Simek, Pascal Pognard, et al. 2017. "Virus-Driven Inflammation Is Associated with the Development of BNabs in Spontaneous Controllers of HIV." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, February. <https://doi.org/10.1093/cid/cix057>.

E

- "En finir avec le sida - Progresser vers les cibles 90-90-90 - Synthèse." n.d., 24.
- Estes, Jacob D., Cissy Kityo, Francis Ssali, Louise Swainson, Krystelle Nganou Makamdop, Gregory Q. Del Prete, Steven G. Deeks, et al. 2017. "Defining Total-Body AIDS-Virus Burden with Implications for Curative Strategies." *Nature Medicine* 23 (11): 1271–76. <https://doi.org/10.1038/nm.4411>.
- Eyerich, Stefanie, Kilian Eyerich, Davide Pennino, Teresa Carbone, Francesca Nasorri, Sabatino Pallotta, Francesca Cianfarani, et al. 2009. "Th22 Cells Represent a Distinct Human T Cell Subset Involved in Epidermal Immunity and Remodeling." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (12): 3573–85. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>.

F

- Faria, Nuno R., Andrew Rambaut, Marc A. Suchard, Guy Baele, Trevor Bedford, Melissa J. Ward, Andrew J. Tatem, et al. 2014. "HIV Epidemiology. The Early Spread and Epidemic Ignition of HIV-1 in Human Populations." *Science (New York, N.Y.)* 346 (6205): 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.1256739>.

Bibliographie

- Farnet, C. M., and W. A. Haseltine. 1991. "Determination of Viral Proteins Present in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complex." *Journal of Virology* 65 (4): 1910–15.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. "HIV-1 Entry Cofactor: Functional CDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor." *Science (New York, N.Y.)* 272 (5263): 872–77.
- Ferrantelli, Flavia, Robert A. Rasmussen, Kathleen A. Buckley, Pei-Lin Li, Tao Wang, David C. Montefiori, Hermann Katinger, et al. 2004. "Complete Protection of Neonatal Rhesus Macaques against Oral Exposure to Pathogenic Simian-Human Immunodeficiency Virus by Human Anti-HIV Monoclonal Antibodies." *The Journal of Infectious Diseases* 189 (12): 2167–73. <https://doi.org/10.1086/420833>.
- Ferre, April L., Peter W. Hunt, Delandy H. McConnell, Megan M. Morris, Juan C. Garcia, Richard B. Pollard, Hal F. Yee, Jeffrey N. Martin, Steven G. Deeks, and Barbara L. Shacklett. 2010. "HIV Controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 Alleles Have Strong, Polyfunctional Mucosal CD4+ T-Cell Responses." *Journal of Virology* 84 (21): 11020–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.00980-10>.
- Florese, Ruth H., Thorsten Demberg, Peng Xiao, LaRene Kuller, Kay Larsen, L. Ebonita Summers, David Venzon, Aurelio Cafaro, Barbara Ensoli, and Marjorie Robert-Guroff. 2009. "Contribution of Nonneutralizing Vaccine-Elicited Antibody Activities to Improved Protective Efficacy in Rhesus Macaques Immunized with Tat/Env Compared with Multigenic Vaccines." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (6): 3718–27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803115>.
- Florese, Ruth H., Koen K. A. Van Rompay, Kris Aldrich, Donald N. Forthal, Gary Landucci, Madhumita Mahalanabis, Nancy Haigwood, et al. 2006. "Evaluation of Passively Transferred, Nonneutralizing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating IgG in Protection of Neonatal Rhesus Macaques against Oral SIVmac251 Challenge." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (6): 4028–36.
- Flynn, Neil M., Donald N. Forthal, Clayton D. Harro, Franklyn N. Judson, Kenneth H. Mayer, Michael F. Para, and rgp120 HIV Vaccine Study Group. 2005. "Placebo-Controlled Phase 3 Trial of a Recombinant Glycoprotein 120 Vaccine to Prevent HIV-1 Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 191 (5): 654–65. <https://doi.org/10.1086/428404>.
- Forthal, Donald N., and Christiane Moog. 2009. "Fc Receptor-Mediated Antiviral Antibodies." *Current Opinion in HIV and AIDS* 4 (5): 388–93. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32832f0a89>.
- Forthal, G. Landucci, and E. S. Daar. 2001. "Antibody from Patients with Acute Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection Inhibits Primary Strains of HIV Type 1 in the Presence of Natural-Killer Effector Cells." *Journal of Virology* 75 (15): 6953–61. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6953-6961.2001>.
- Foster, John L., and J. Victor Garcia. 2008. "HIV-1 Nef: At the Crossroads." *Retrovirology* 5 (September): 84. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-84>.
- French, Martyn A., Laila N. Abudulai, and Sonia Fernandez. 2013. "Isotype Diversification of IgG Antibodies to HIV Gag Proteins as a Therapeutic Vaccination Strategy for HIV Infection." *Vaccines* 1 (3): 328–42. <https://doi.org/10.3390/vaccines1030328>.
- French, Martyn A., Rob J. Center, Kim M. Wilson, Ibrahim Fleyfel, Sonia Fernandez, Anna Schorcht, Ivan Stratov, Marit Kramski, Stephen J. Kent, and Anthony D. Kelleher. 2013. "Isotype-Switched Immunoglobulin G Antibodies to HIV Gag Proteins May Provide Alternative or Additional Immune Responses to 'protective' Human Leukocyte

- Antigen-B Alleles in HIV Controllers." *AIDS (London, England)* 27 (4): 519–28. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835cb720>.
- Freund, Natalia T., Haoqing Wang, Louise Scharf, Lilian Nogueira, Joshua A. Horwitz, Yotam Bar-On, Jovana Golijanin, et al. 2017. "Coexistence of Potent HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies and Antibody-Sensitive Viruses in a Viremic Controller." *Science Translational Medicine* 9 (373): eaal2144. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal2144>.
- G**
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, and B. Safai. 1984. "Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS." *Science (New York, N.Y.)* 224 (4648): 500–503.
- Galperin, Moran, Carine Farenc, Madhura Mukhopadhyay, Dhilshan Jayasinghe, Amandine Decroos, Daniela Benati, Li Lynn Tan, et al. 2018. "CD4+ T Cell-Mediated HLA Class II Cross-Restriction in HIV Controllers." *Science Immunology* 3 (24). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat0687>.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, et al. 2000. "DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein That Enhances Trans-Infection of T Cells." *Cell* 100 (5): 587–97.
- Gillis, Caitlin, Aurélie Gouel-Chéron, Friederike Jönsson, and Pierre Bruhns. 2014. "Contribution of Human FcγRs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies." *Frontiers in Immunology* 5: 254. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00254>.
- Gong, Siqi, Khamis Tomusange, Viraj Kulkarni, Opeyemi S. Adeniji, Samir K. Lakhashe, Dinesh Hariraju, Amanda Strickland, et al. 2018. "Anti-HIV IgM Protects against Mucosal SHIV Transmission." *AIDS (London, England)* 32 (11): F5–13. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001857>.
- González, Nuria, Krisha McKee, Rebecca M. Lynch, Ivelin S. Georgiev, Laura Jimenez, Eulalia Grau, Eloísa Yuste, Peter D. Kwong, John R. Mascola, and José Alcamí. 2018. "Characterization of Broadly Neutralizing Antibody Responses to HIV-1 in a Cohort of Long Term Non-Progressors." Edited by Kevin K Ariën. *PLOS ONE* 13 (3): e0193773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193773>.
- Goujard, Cécile, Marie-Laure Chaix, Olivier Lambotte, Christiane Deveau, Martine Sinet, Julien Guernon, Valérie Courgnaud, et al. 2009. "Spontaneous Control of Viral Replication during Primary HIV Infection: When Is 'HIV Controller' Status Established?" *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 49 (6): 982–86. <https://doi.org/10.1086/605504>.
- Grabar, Sophie, Hana Selinger-Leneman, Sophie Abgrall, Gilles Pialoux, Laurence Weiss, and Dominique Costagliola. 2009. "Prevalence and Comparative Characteristics of Long-Term Nonprogressors and HIV Controller Patients in the French Hospital Database on HIV." *AIDS (London, England)* 23 (9): 1163–69. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832b44c8>.
- Gray, Elin S., Maphuti C. Madiga, Penny L. Moore, Koleka Mlisana, Salim S. Abdool Karim, James M. Binley, George M. Shaw, John R. Mascola, and Lynn Morris. 2009. "Broad Neutralization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mediated by Plasma

Bibliographie

- Antibodies against the Gp41 Membrane Proximal External Region." *Journal of Virology* 83 (21): 11265–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.01359-09>.
- Gupta, Ravindra K., Sultan Abdul-Jawad, Laura E. McCoy, Hoi Ping Mok, Dimitra Peppas, Maria Salgado, Javier Martinez-Picado, et al. 2019. "HIV-1 Remission Following CCR5Δ32/Δ32 Haematopoietic Stem-Cell Transplantation." *Nature*, March. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>.
- H**
- Haim, Hillel, Ignacio Salas, and Joseph Sodroski. 2013. "Proteolytic Processing of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein Precursor Decreases Conformational Flexibility." *Journal of Virology* 87 (3): 1884–89. <https://doi.org/10.1128/JVI.02765-12>.
- Hammer, Scott M., Magdalena E. Sobieszczyk, Holly Janes, Shelly T. Karuna, Mark J. Mulligan, Doug Grove, Beryl A. Koblin, et al. 2013. "Efficacy Trial of a DNA/RAD5 HIV-1 Preventive Vaccine." *The New England Journal of Medicine* 369 (22): 2083–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310566>.
- Hemelaar, Joris. 2012. "The Origin and Diversity of the HIV-1 Pandemic." *Trends in Molecular Medicine* 18 (3): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001>.
- Henriet, Simon, Gaëlle Mercenne, Serena Bernacchi, Jean-Christophe Paillart, and Roland Marquet. 2009. "Tumultuous Relationship between the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Infectivity Factor (Vif) and the Human APOBEC-3G and APOBEC-3F Restriction Factors." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 73 (2): 211–32. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-08>.
- Heß, Rebecca, Michael Storcksdieck Genannt Bonsmann, Dennis Lapuente, Andre Maaske, Carsten Kirschning, Jürgen Ruland, Bernd Lepenies, Drew Hannaman, Matthias Tenbusch, and Klaus Überla. 2019. "Glycosylation of HIV Env Impacts IgG Subtype Responses to Vaccination." *Viruses* 11 (2). <https://doi.org/10.3390/v11020153>.
- Hessell, Ann J., Lars Hangartner, Meredith Hunter, Carin E. G. Havenith, Frank J. Beurskens, Joost M. Bakker, Caroline M. S. Lanigan, et al. 2007. "Fc Receptor but Not Complement Binding Is Important in Antibody Protection against HIV." *Nature* 449 (7158): 101–4. <https://doi.org/10.1038/nature06106>.
- Hessell, Ann J., J. Pablo Jaworski, Erin Epton, Kenta Matsuda, Shilpi Pandey, Christoph Kahl, Jason Reed, et al. 2016. "Early Short-Term Treatment with Neutralizing Human Monoclonal Antibodies Halts SHIV Infection in Infant Macaques." *Nature Medicine* 22 (4): 362–68. <https://doi.org/10.1038/nm.4063>.
- Hessell, Ann J., Eva G. Rakasz, David M. Tehrani, Michael Huber, Kimberly L. Weisgrau, Gary Landucci, Donald N. Forthal, et al. 2010. "Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies 2F5 and 4E10 Directed against the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gp41 Membrane-Proximal External Region Protect against Mucosal Challenge by Simian-Human Immunodeficiency Virus SHIVBa-L." *Journal of Virology* 84 (3): 1302–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.01272-09>.
- Hirsch, V. M., S. Goldstein, N. A. Hynes, W. R. Elkins, W. T. London, P. M. Zack, D. Montefiori, and P. R. Johnson. 1994. "Prolonged Clinical Latency and Survival of Macaques given a Whole Inactivated Simian Immunodeficiency Virus Vaccine." *The Journal of Infectious Diseases* 170 (1): 51–59.
- "HIV/AIDS Treatment Guidelines." n.d. AIDSinfo. Accessed November 10, 2014. <http://aidsinfo.nih.gov/>.

- Hocini, Hakim, Henri Bonnabau, Christine Lacabaratz, Cécile Lefebvre, Pascaline Tisserand, Emile Foucat, Jean-Daniel Lelièvre, et al. 2019. "HIV Controllers Have Low Inflammation Associated with a Strong HIV-Specific Immune Response in Blood." *Journal of Virology*, February. <https://doi.org/10.1128/JVI.01690-18>.
- Holl, Vincent, Stéphane Hemmerter, Renaud Burrer, Sylvie Schmidt, Alain Bohbot, Anne-Marie Aubertin, and Christiane Moog. 2004. "Involvement of Fc Gamma RI (CD64) in the Mechanism of HIV-1 Inhibition by Polyclonal IgG Purified from Infected Patients in Cultured Monocyte-Derived Macrophages." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (10): 6274–83.
- Holl, Vincent, Maryse Peressin, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Susan Zolla-Pazner, Anne-Marie Aubertin, and Christiane Moog. 2006. "Nonneutralizing Antibodies Are Able to Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Macrophages and Immature Dendritic Cells." *Journal of Virology* 80 (12): 6177–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.02625-05>.
- Holl, Vincent, Maryse Peressin, Sylvie Schmidt, Thomas Decoville, Susan Zolla-Pazner, Anne-Marie Aubertin, and Christiane Moog. 2006. "Efficient Inhibition of HIV-1 Replication in Human Immature Monocyte-Derived Dendritic Cells by Purified Anti-HIV-1 IgG without Induction of Maturation." *Blood* 107 (11): 4466–74. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3490>.
- Horwitz, Yotam Bar-On, Ching-Lan Lu, Daniela Fera, Ainsley A. K. Lockhart, Julio C. C. Lorenzi, Lilian Nogueira, et al. 2017. "Non-Neutralizing Antibodies Alter the Course of HIV-1 Infection In Vivo." *Cell*, July. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.048>.
- Horwitz, Ariel Halper-Stromberg, Hugo Mouquet, Alexander D. Gitlin, Anna Tretiakova, Thomas R. Eisenreich, Marine Malbec, et al. 2013. "HIV-1 Suppression and Durable Control by Combining Single Broadly Neutralizing Antibodies and Antiretroviral Drugs in Humanized Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (41): 16538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315295110>.
- Horwitz, J. P., J. Chua, M. Noel, and M. A. Darooge. 1964. "NUCLEOSIDES. IV. 1-(2-DEOXY-BETA-D-LYXOFURANOSYL)-5-IOUOURACIL." *Journal of Medicinal Chemistry* 7: 385–86.
- Houzet, Laurent, Jean Christophe Paillart, Fatima Smagulova, Stephan Maurel, Zakia Morichaud, Roland Marquet, and Marylène Mougel. 2007. "HIV Controls the Selective Packaging of Genomic, Spliced Viral and Cellular RNAs into Virions through Different Mechanisms." *Nucleic Acids Research* 35 (8): 2695–2704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm153>.
- Hrecka, Kasia, Caili Hao, Magda Gierszewska, Selene K. Swanson, Malgorzata Kesik-Brodacka, Smita Srivastava, Laurence Florens, Michael P. Washburn, and Jacek Skowronski. 2011. "Vpx Relieves Inhibition of HIV-1 Infection of Macrophages Mediated by the SAMHD1 Protein." *Nature* 474 (7353): 658–61. <https://doi.org/10.1038/nature10195>.
- Hu, Wei-Shau, and Stephen H. Hughes. 2012. "HIV-1 Reverse Transcription." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>.
- Huber, M., and A. Trkola. 2007. "Humoral Immunity to HIV-1: Neutralization and Beyond." *Journal of Internal Medicine* 262 (1): 5–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01819.x>.
- Hütter, Gero, Daniel Nowak, Maximilian Mossner, Susanne Ganepola, Arne Müssig, Kristina Allers, Thomas Schneider, et al. 2009. "Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation." *The New England Journal of Medicine* 360 (7): 692–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>.

Bibliographie

I

- Iglesias, Maria Candela, Jorge R. Almeida, Solène Fastenackels, David J. van Bockel, Masao Hashimoto, Vanessa Venturi, Emma Gostick, et al. 2011. "Escape from Highly Effective Public CD8+ T-Cell Clonotypes by HIV." *Blood* 118 (8): 2138–49. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-328781>.
- International HIV Controllers Study, Florencia Pereyra, Xiaoming Jia, Paul J. McLaren, Amalio Telenti, Paul I. W. de Bakker, Bruce D. Walker, et al. 2010. "The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation." *Science (New York, N.Y.)* 330 (6010): 1551–57. <https://doi.org/10.1126/science.1195271>.
- Iwabu, Yukie, Hideaki Fujita, Masanobu Kinomoto, Keiko Kaneko, Yukihito Ishizaka, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga. 2009. "HIV-1 Accessory Protein Vpu Internalizes Cell-Surface BST-2/Tetherin through Transmembrane Interactions Leading to Lysosomes." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50): 35060–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058305>.

J

- Johnson, Susan, Michael Eller, Jeffrey E. Teigler, Sebastien M. Malveste, Bruce T. Schultz, Damien Z. Soghoian, Richard Lu, et al. 2015. "Cooperativity of HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cells and CD8 T Cells in Control of HIV Viremia." *Journal of Virology* 89 (15): 7494–7505. <https://doi.org/10.1128/JVI.00438-15>.
- Jolly, Clare, and Quentin J. Sattentau. 2004. "Retroviral Spread by Induction of Virological Synapses." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5 (9): 643–50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00209.x>.
- Joseph, Sarah B., Ronald Swanstrom, Angela D. M. Kashuba, and Myron S. Cohen. 2015. "Bottlenecks in HIV-1 Transmission: Insights from the Study of Founder Viruses." *Nature Reviews Microbiology* 13 (7): 414–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3471>.

K

- Kaminski, Denise A., Chungwen Wei, Yu Qian, Alexander F. Rosenberg, and Ignacio Sanz. 2012. "Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling." *Frontiers in Immunology* 3: 302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00302>.
- Kanters, Steve, Maria Eugenia Socias, Nicholas I. Paton, Marco Vitoria, Meg Doherty, Dieter Ayers, Evan Popoff, et al. 2017. "Comparative Efficacy and Safety of Second-Line Antiretroviral Therapy for Treatment of HIV/AIDS: A Systematic Review and Network Meta-Analysis." *The Lancet. HIV* 4 (10): e433–41. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(17\)30109-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(17)30109-1).
- Karn, Jonathan, and C. Martin Stoltzfus. 2012. "Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (2): a006916. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>.
- Kaufmann, Daniel E., Daniel G. Kavanagh, Florencia Pereyra, John J. Zaunders, Elizabeth W. Mackey, Toshiyuki Miura, Sarah Palmer, et al. 2007. "Upregulation of CTLA-4 by HIV-Specific CD4+ T Cells Correlates with Disease Progression and Defines a Reversible Immune Dysfunction." *Nature Immunology* 8 (11): 1246–54. <https://doi.org/10.1038/ni1515>.

- Keele, Brandon F., Fran Van Heuverswyn, Yingying Li, Elizabeth Bailes, Jun Takehisa, Mario L. Santiago, Frederic Bibollet-Ruche, et al. 2006. "Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1." *Science* 313 (5786): 523–526.
- Kim, C. J., A. Nazli, O. L. Rojas, D. Chege, Z. Alidina, S. Huibner, S. Mujib, et al. 2012. "A Role for Mucosal IL-22 Production and Th22 Cells in HIV-Associated Mucosal Immunopathogenesis." *Mucosal Immunology* 5 (6): 670–80. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.72>.
- Klasse, P. J., and Q. J. Sattentau. 2002. "Occupancy and Mechanism in Antibody-Mediated Neutralization of Animal Viruses." *The Journal of General Virology* 83 (Pt 9): 2091–2108. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2091>.
- Klatt, Nichole R., Ryan Cheu, Kenzie Birse, Alexander S. Zevin, Michelle Perner, Laura Noël-Romas, Anneke Grobler, et al. 2017. "Vaginal Bacteria Modify HIV Tenofovir Microbicide Efficacy in African Women." *Science (New York, N.Y.)* 356 (6341): 938–45. <https://doi.org/10.1126/science.aai9383>.
- Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. "T-Lymphocyte T4 Molecule Behaves as the Receptor for Human Retrovirus LAV." *Nature* 312 (5996): 767–68.
- Kong, Rui, Kai Xu, Tongqing Zhou, Priyamvada Acharya, Thomas Lemmin, Kevin Liu, Gabriel Ozorowski, et al. 2016. "Fusion Peptide of HIV-1 as a Site of Vulnerability to Neutralizing Antibody." *Science (New York, N.Y.)* 352 (6287): 828–33. <https://doi.org/10.1126/science.aae0474>.
- Kosmrlj, Andrej, Elizabeth L. Read, Ying Qi, Todd M. Allen, Marcus Altfeld, Steven G. Deeks, Florencia Pereyra, Mary Carrington, Bruce D. Walker, and Arup K. Chakraborty. 2010. "Effects of Thymic Selection of the T-Cell Repertoire on HLA Class I-Associated Control of HIV Infection." *Nature* 465 (7296): 350–54. <https://doi.org/10.1038/nature08997>.
- Krell, Tino, Frédéric Greco, Olivier Engel, Jean Dubayle, Joseline Dubayle, Audrey Kennel, Benoit Charlotiaux, et al. 2004. "HIV-1 Gp41 and Gp160 Are Hyperthermostable Proteins in a Mesophilic Environment. Characterization of Gp41 Mutants." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 271 (8): 1566–79. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04068.x>.
- Kwon, Young Do, Marie Pancera, Priyamvada Acharya, Ivelin S. Georgiev, Emma T. Crooks, Jason Gorman, M. Gordon Joyce, et al. 2015. "Crystal Structure, Conformational Fixation and Entry-Related Interactions of Mature Ligand-Free HIV-1 Env." *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (7): 522–31. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3051>.
- Kwong, and John R. Mascola. 2012. "Human Antibodies That Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies." *Immunity* 37 (3): 412–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.012>.
- Kwong, John R. Mascola, and Gary J. Nabel. 2013. "Broadly Neutralizing Antibodies and the Search for an HIV-1 Vaccine: The End of the Beginning." *Nature Reviews. Immunology* 13 (9): 693–701. <https://doi.org/10.1038/nri3516>.
- Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. "Structure of an HIV Gp120 Envelope Glycoprotein in Complex with the CD4 Receptor and a Neutralizing Human Antibody." *Nature* 393 (6686): 648–59. <https://doi.org/10.1038/31405>.

Bibliographie

L

- Ladell, Kristin, Masao Hashimoto, Maria Candela Iglesias, Pascal G. Wilmann, James E. McLaren, Stéphanie Gras, Takayuki Chikata, et al. 2013. "A Molecular Basis for the Control of Preimmune Escape Variants by HIV-Specific CD8+ T Cells." *Immunity* 38 (3): 425–36. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.021>.
- Laguette, Nadine, Christelle Brégnard, Pauline Hue, Jihane Basbous, Ahmad Yatim, Marion Larroque, Frank Kirchhoff, Angelos Constantinou, Bijan Sobhian, and Monsef Benkirane. 2014. "Premature Activation of the SLX4 Complex by Vpr Promotes G2/M Arrest and Escape from Innate Immune Sensing." *Cell* 156 (1–2): 134–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.011>.
- Laguette, Nadine, Bijan Sobhian, Nicoletta Casartelli, Mathieu Ringard, Christine Chable-Bessia, Emmanuel Ségéral, Ahmad Yatim, Stéphane Emiliani, Olivier Schwartz, and Monsef Benkirane. 2011. "SAMHD1 Is the Dendritic- and Myeloid-Cell-Specific HIV-1 Restriction Factor Counteracted by Vpx." *Nature* 474 (7353): 654–57. <https://doi.org/10.1038/nature10117>.
- Lahouassa, Hichem, Waaqo Daddacha, Henning Hofmann, Diana Ayinde, Eric C. Logue, Loïc Dragin, Nicolin Bloch, et al. 2012. "SAMHD1 Restricts the Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Depleting the Intracellular Pool of Deoxynucleoside Triphosphates." *Nature Immunology* 13 (3): 223–28. <https://doi.org/10.1038/ni.2236>.
- Lal, R. B., I. M. Heiba, R. R. Dhawan, E. S. Smith, and P. L. Perine. 1991. "IgG Subclass Responses to Human Immunodeficiency Virus-1 Antigens: Lack of IgG2 Response to Gp41 Correlates with Clinical Manifestation of Disease." *Clinical Immunology and Immunopathology* 58 (2): 267–77.
- Lambotte, Olivier, Faroudy Boufassa, Yoann Madec, Ahn Nguyen, Cécile Goujard, Laurence Meyer, Christine Rouzioux, Alain Venet, and Jean-François Delfraissy. 2005. "HIV Controllers: A Homogeneous Group of HIV-1-Infected Patients with Spontaneous Control of Viral Replication." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 41 (7): 1053–56. <https://doi.org/10.1086/433188>.
- Lambotte, Olivier, Guido Ferrari, Christiane Moog, Nicole L. Yates, Hua-Xin Liao, Robert J. Parks, Charles B. Hicks, et al. 2009. "Heterogeneous Neutralizing Antibody and Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity Responses in HIV-1 Elite Controllers." *AIDS (London, England)* 23 (8): 897–906. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328329f97d>.
- Lambotte, Olivier, Justin Pollara, Faroudy Boufassa, Christiane Moog, Alain Venet, Barton F. Haynes, Jean-François Delfraissy, Asier Saez-Cirion, and Guido Ferrari. 2013. "High Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Are Correlated with Strong CD8 T Cell Viral Suppressive Activity but Not with B57 Status in HIV-1 Elite Controllers." *PLoS One* 8 (9): e74855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074855>.
- Larrouy, Brun-Vézinet, and Descamps. 2010. "Mutations Au Niveau Des Sites de Clivage de Gag et Du Changement de Cadre de Lecture Gag-Pol Du VIH-1 et Réponse Virologique à Un Traitement Par Inhibiteurs de Protéase." *Virologie* 14 (2): 119–28. <https://doi.org/10.1684/vir.2010.0289>.
- Lê Cao, Kim-Anh, Simon Boitard, and Philippe Besse. 2011. "Sparse PLS Discriminant Analysis: Biologically Relevant Feature Selection and Graphical Displays for Multiclass Problems." *BMC Bioinformatics* 12 (June): 253. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-253>.

- Lee, Guinevere Q., and Mathias Lichterfeld. 2016. "Diversity of HIV-1 Reservoirs in CD4+ T-Cell Subpopulations." *Current Opinion in HIV and AIDS* 11 (4): 383–87. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000281>.
- Lee, and Stephen J. Kent. 2018. "Anti-HIV-1 Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: Is There More to Antibodies than Neutralization?" *Current Opinion in HIV and AIDS* 13 (2): 160–66. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000439>.
- Lelièvre, Jean-Daniel, and Yves Lévy. 2016. "HIV-1 Prophylactic Vaccines: State of the Art." *Journal of Virus Eradication* 2 (1): 5–11.
- Lewin, Sharon R., and Christine Rouzioux. 2011. "HIV Cure and Eradication: How Will We Get from the Laboratory to Effective Clinical Trials?" *AIDS (London, England)* 25 (7): 885–97. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283467041>.
- Li, Yuxing, Stephen A. Migueles, Brent Welcher, Krisha Svehla, Adhuna Phogat, Mark K. Louder, Xueling Wu, et al. 2007. "Broad HIV-1 Neutralization Mediated by CD4-Binding Site Antibodies." *Nature Medicine* 13 (9): 1032–34. <https://doi.org/10.1038/nm1624>.
- Linterman, Michelle A., Wim Pierson, Sau K. Lee, Axel Kallies, Shimpei Kawamoto, Tim F. Rayner, Monika Srivastava, et al. 2011. "Foxp3+ Follicular Regulatory T Cells Control the Germinal Center Response." *Nature Medicine* 17 (8): 975–82. <https://doi.org/10.1038/nm.2425>.
- Liu, Khader Ghneim, Devin Sok, William J. Bosche, Yuan Li, Elizabeth Chipriano, Brian Berkemeier, et al. 2016. "Antibody-Mediated Protection against SHIV Challenge Includes Systemic Clearance of Distal Virus." *Science (New York, N.Y.)* 353 (6303): 1045–49. <https://doi.org/10.1126/science.aag0491>.
- Liu, Hao Liu, Byung Oh Kim, Vincent H. Gattone, Jinliang Li, Avindra Nath, Janice Blum, and Johnny J. He. 2004. "CD4-Independent Infection of Astrocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1: Requirement for the Human Mannose Receptor." *Journal of Virology* 78 (8): 4120–33.
- Lofano, Giuseppe, Matthew J. Gorman, Ashraf S. Yousif, Wen-Han Yu, Julie M. Fox, Anne-Sophie Dugast, Margaret E. Ackerman, et al. 2018. "Antigen-Specific Antibody Fc Glycosylation Enhances Humoral Immunity via the Recruitment of Complement." *Science Immunology* 3 (26). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat7796>.
- Lorin, Valérie, and Hugo Mouquet. 2015. "Efficient Generation of Human IgA Monoclonal Antibodies." *Journal of Immunological Methods* 422 (July): 102–10. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.010>.

M

- Ma, Cindy S., Elissa K. Deenick, Marcel Batten, and Stuart G. Tangye. 2012. "The Origins, Function, and Regulation of T Follicular Helper Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (7): 1241–53. <https://doi.org/10.1084/jem.20120994>.
- Madhavi, Vijaya, Bruce D. Wines, Janaki Amin, Sean Emery, ENCORE1 Study Group, Ester Lopez, Anthony Kelleher, et al. 2017. "HIV-1 Env- and Vpu-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Associated with Elite Control of HIV." *Journal of Virology* 91 (18). <https://doi.org/10.1128/JVI.00700-17>.
- Magadán, Javier G., and Juan S. Bonifacio. 2012. "Transmembrane Domain Determinants of CD4 Downregulation by HIV-1 Vpu." *Journal of Virology* 86 (2): 757–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.05933-11>.

Bibliographie

- Malhotra, U., S. Holte, S. Dutta, M. M. Berrey, E. Delpit, D. M. Koelle, A. Sette, L. Corey, and M. J. McElrath. 2001. "Role for HLA Class II Molecules in HIV-1 Suppression and Cellular Immunity Following Antiretroviral Treatment." *The Journal of Clinical Investigation* 107 (4): 505–17. <https://doi.org/10.1172/JCI11275>.
- Mangeat, Bastien, Priscilla Turelli, Gersende Caron, Marc Friedli, Luc Perrin, and Didier Trono. 2003. "Broad Antiretroviral Defence by Human APOBEC3G through Lethal Editing of Nascent Reverse Transcripts." *Nature* 424 (6944): 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature01709>.
- Mariani, Roberto, Darlene Chen, Bärbel Schröfelbauer, Francisco Navarro, Renate König, Brooke Bollman, Carsten Münk, Henrietta Nymark-McMahon, and Nathaniel R. Landau. 2003. "Species-Specific Exclusion of APOBEC3G from HIV-1 Virions by Vif." *Cell* 114 (1): 21–31.
- Marin, Mariana, Kristine M. Rose, Susan L. Kozak, and David Kabat. 2003. "HIV-1 Vif Protein Binds the Editing Enzyme APOBEC3G and Induces Its Degradation." *Nature Medicine* 9 (11): 1398–1403. <https://doi.org/10.1038/nm946>.
- Marini, Bruna, Attila Kertesz-Farkas, Hashim Ali, Bojana Lucic, Kamil Lisek, Lara Manganaro, Sandor Pongor, et al. 2015. "Nuclear Architecture Dictates HIV-1 Integration Site Selection." *Nature* 521 (7551): 227–31. <https://doi.org/10.1038/nature14226>.
- Martinez, Valérie, Dominique Costagliola, Olivia Bonduelle, Nicole N'go, Aurélie Schnuriger, Ioannis Théodorou, Jean-Pierre Clauvel, et al. 2005. "Combination of HIV-1-Specific CD4 Th1 Cell Responses and IgG2 Antibodies Is the Best Predictor for Persistence of Long-Term Nonprogression." *The Journal of Infectious Diseases* 191 (12): 2053–63. <https://doi.org/10.1086/430320>.
- Mascola, and David C. Montefiori. 2010. "The Role of Antibodies in HIV Vaccines." *Annual Review of Immunology* 28: 413–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101256>.
- Mascola, G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, et al. 2000. "Protection of Macaques against Vaginal Transmission of a Pathogenic HIV-1/SIV Chimeric Virus by Passive Infusion of Neutralizing Antibodies." *Nature Medicine* 6 (2): 207–10. <https://doi.org/10.1038/72318>.
- McCormack, Sheena, Gita Ramjee, Anatoli Kamali, Helen Rees, Angela M. Crook, Mitzy Gafos, Ute Jentsch, et al. 2010. "PRO2000 Vaginal Gel for Prevention of HIV-1 Infection (Microbicides Development Programme 301): A Phase 3, Randomised, Double-Blind, Parallel-Group Trial." *Lancet (London, England)* 376 (9749): 1329–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61086-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61086-0).
- McCoy, Laura E., and Dennis R. Burton. 2017. "Identification and Specificity of Broadly Neutralizing Antibodies against HIV." *Immunological Reviews* 275 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12484>.
- Melikyan, Gregory B. 2008. "Common Principles and Intermediates of Viral Protein-Mediated Fusion: The HIV-1 Paradigm." *Retrovirology* 5 (December): 111. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-111>.
- Melikyan, Gregory B. 2014. "HIV Entry: A Game of Hide-and-Fuse?" *Current Opinion in Virology* 4 (February): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.09.004>.
- Mergener, K., W. Enzensberger, H. Rübsamen-Waigmann, H. von Briesen, and H. W. Doerr. 1987. "Immunoglobulin Class- and Subclass-Specific HIV Antibody Detection in Serum and CSF Specimens by ELISA and Western Blot." *Infection* 15 (5): 317–22.

- Migueles, Stephen A., Alisha C. Laborico, W. Lesley Shupert, M. Shirin Sabbaghian, Ronald Rabin, Claire W. Hallahan, Debbie Van Baarle, et al. 2002. "HIV-Specific CD8+ T Cell Proliferation Is Coupled to Perforin Expression and Is Maintained in Nonprogressors." *Nature Immunology* 3 (11): 1061–68. <https://doi.org/10.1038/ni845>.
- Mikell, Iliyana, D. Noah Sather, Spyros A. Kalams, Marcus Altfeld, Galit Alter, and Leonidas Stamatatos. 2011. "Characteristics of the Earliest Cross-Neutralizing Antibody Response to HIV-1." *PLoS Pathogens* 7 (1): e1001251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001251>.
- Mikolajczyk, Malgorzata G., Nelydia F. Concepcion, Theresa Wang, Douglas Frazier, Basil Golding, Carl E. Frasch, and Dorothy E. Scott. 2004. "Characterization of Antibodies to Capsular Polysaccharide Antigens of Haemophilus Influenzae Type b and Streptococcus Pneumoniae in Human Immune Globulin Intravenous Preparations." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11 (6): 1158–64. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.6.1158-1164.2004>.
- Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes: Studies of Organization and Composition." *Journal of Virology* 71 (7): 5382–90.
- Mirande. 2008. "Détournement d'ARNt Cellulaire Par Le VIH-1." *Virologie* 12 (2): 95–103. <https://doi.org/10.1684/vir.2008.0155>.
- Moir, Susan, and Anthony S. Fauci. 2009. "B Cells in HIV Infection and Disease." *Nature Reviews. Immunology* 9 (4): 235–45. <https://doi.org/10.1038/nri2524>.
- . 2013. "Insights into B Cells and HIV-Specific B-Cell Responses in HIV-Infected Individuals." *Immunological Reviews* 254 (1): 207–24. <https://doi.org/10.1111/imr.12067>.
- Moldt, Brian, Eva G. Rakasz, Niccole Schultz, Po-Ying Chan-Hui, Kristine Swiderek, Kimberly L. Weisgrau, Shari M. Piaskowski, et al. 2012. "Highly Potent HIV-Specific Antibody Neutralization in Vitro Translates into Effective Protection against Mucosal SHIV Challenge in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46): 18921–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214785109>.
- Montefiori, D. C., G. Pantaleo, L. M. Fink, J. T. Zhou, J. Y. Zhou, M. Bilska, G. D. Miralles, and A. S. Fauci. 1996. "Neutralizing and Infection-Enhancing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Long-Term Nonprogressors." *The Journal of Infectious Diseases* 173 (1): 60–67. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.1.60>.
- Montero, Marinieve, Nienke E. van Houten, Xin Wang, and Jamie K. Scott. 2008. "The Membrane-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope: Dominant Site of Antibody Neutralization and Target for Vaccine Design." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 72 (1): 54–84, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-07>.
- Moog, C., H. J. Fleury, I. Pellegrin, A. Kirn, and A. M. Aubertin. 1997. "Autologous and Heterologous Neutralizing Antibody Responses Following Initial Seroconversion in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals." *Journal of Virology* 71 (5): 3734–41.
- Moog, C., C. Spenlehauer, H. Fleury, F. Heshmati, S. Saragosti, F. Letourneur, A. Kirn, and A. M. Aubertin. 1997. "Neutralization of Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates: A Study of Parameters Implicated in Neutralization in Vitro." *AIDS Research and Human Retroviruses* 13 (1): 19–27.

Bibliographie

- “Morlat, 2017. Rapport Sur La Prise En Charge Des Personnes Vivant Avec Le VIH.” n.d. https://cns.sante.fr/wp-content/uploads/2017/10/experts-vih_epidemie.pdf.
- Moulard, M., and E. Decroly. 2000. “Maturation of HIV Envelope Glycoprotein Precursors by Cellular Endoproteases.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1469 (3): 121–32.
- Mourez, T., F. Simon, and J.-C. Plantier. 2013. “Non-M Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1.” *Clinical Microbiology Reviews* 26 (3): 448–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-13>.

N

- Nabi, Rafiq, Zina Moldoveanu, Qing Wei, Elizabeth T. Golub, Helen G. Durkin, Ruth M. Greenblatt, Betsy C. Herold, et al. 2017. “Differences in Serum IgA Responses to HIV-1 Gp41 in Elite Controllers Compared to Viral Suppressors on Highly Active Antiretroviral Therapy.” *PloS One* 12 (7): e0180245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180245>.
- Nel, Annalene, Neliëtte van Niekerk, Saidi Kapiga, Linda-Gail Bekker, Cynthia Gama, Katherine Gill, Anatoli Kamali, et al. 2016. “Safety and Efficacy of a Dapivirine Vaginal Ring for HIV Prevention in Women.” *New England Journal of Medicine* 375 (22): 2133–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602046>.
- Ngo-Giang-Huong, N., D. Candotti, A. Goubar, B. Autran, M. Maynard, D. Sicard, J. P. Clauvel, H. Agut, D. Costagliola, and C. Rouzioux. 2001. “HIV Type 1-Specific IgG2 Antibodies: Markers of Helper T Cell Type 1 Response and Prognostic Marker of Long-Term Nonprogression.” *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (15): 1435–46. <https://doi.org/10.1089/088922201753197105>.
- Nimmerjahn, Falk, and Jeffrey V. Ravetch. 2008. “Analyzing Antibody-Fc-Receptor Interactions.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 415: 151–62. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-570-1_9.
- Nishimura, Yoshiaki, Rajeev Gautam, Tae-Wook Chun, Reza Sadjadpour, Kathryn E. Foulds, Masashi Shingai, Florian Klein, et al. 2017. “Early Antibody Therapy Can Induce Long-Lasting Immunity to SHIV.” *Nature* 543 (7646): 559–63. <https://doi.org/10.1038/nature21435>.
- Nisole, Sébastien, and Ali Saïb. 2004. “Early Steps of Retrovirus Replicative Cycle.” *Retrovirology* 1 (May): 9. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-9>.
- Nora, Tamara, Charlotte Charpentier, Olivier Tenaillon, Claire Hoede, François Clavel, and Allan J. Hance. 2007. “Contribution of Recombination to the Evolution of Human Immunodeficiency Viruses Expressing Resistance to Antiretroviral Treatment.” *Journal of Virology* 81 (14): 7620–28. <https://doi.org/10.1128/JVI.00083-07>.

O

- ONUSIDA. 2014. “90-90-90 Une Cible Ambitieuse de Traitement Pour Aider à Mettre Fin à l'épidémie Du Sida.”
- “ONUSIDA / UNAIDS.” n.d. <http://www.unaids.org/>.
- Pan-Hammarström, Qiang, Yaofeng Zhao, and Lennart Hammarström. 2007. “Class Switch Recombination: A Comparison between Mouse and Human.” *Advances in Immunology* 93: 1–61. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)93001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)93001-6).

P

- Pantaleo, G., S. Menzo, M. Vaccarezza, C. Graziosi, O. J. Cohen, J. F. Demarest, D. Montefiori, J. M. Orenstein, C. Fox, and L. K. Schrager. 1995. "Studies in Subjects with Long-Term Nonprogressive Human Immunodeficiency Virus Infection." *The New England Journal of Medicine* 332 (4): 209–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM199501263320402>.
- Pensiero, Simone, Laura Galli, Silvia Nozza, Nicolas Ruffin, Antonella Castagna, Giuseppe Tambussi, Bo Hejdeman, et al. 2013. "B-Cell Subset Alterations and Correlated Factors in HIV-1 Infection." *AIDS (London, England)* 27 (8): 1209–17. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835edc47>.
- Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho. 1996. "HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5255): 1582–86.
- Peressin, V. Holl, S. Schmidt, T. Decoville, D. Mirisky, A. Lederle, M. Delaporte, K. Xu, A. M. Aubertin, and C. Moog. 2011. "HIV-1 Replication in Langerhans and Interstitial Dendritic Cells Is Inhibited by Neutralizing and Fc-Mediated Inhibitory Antibodies." *Journal of Virology* 85 (2): 1077–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.01619-10>.
- Peressin, Vincent Holl, and Christiane Moog. 2014. "[Anti-HIV antibodies: multiple antiviral activities]." *Médecine Sciences: M/S* 30 (1): 69–75. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143001016>.
- Pereyra, Florencia, Marylyn M. Addo, Daniel E. Kaufmann, Yang Liu, Toshiyuki Miura, Almas Rathod, Brett Baker, et al. 2008. "Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy." *The Journal of Infectious Diseases* 197 (4): 563–71. <https://doi.org/10.1086/526786>.
- Perez, Lautaro G., Matthew R. Costa, Christopher A. Todd, Barton F. Haynes, and David C. Montefiori. 2009. "Utilization of Immunoglobulin G Fc Receptors by Human Immunodeficiency Virus Type 1: A Specific Role for Antibodies against the Membrane-Proximal External Region of Gp41." *Journal of Virology* 83 (15): 7397–7410. <https://doi.org/10.1128/JVI.00656-09>.
- Pérez-Enciso, Miguel, and Michel Tenenhaus. 2003. "Prediction of Clinical Outcome with Microarray Data: A Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) Approach." *Human Genetics* 112 (5–6): 581–92. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-0921-9>.
- Pernas, Maria, Victor Sanchez-Merino, Concepcion Casado, Alberto Merino-Mansilla, Isabel Olivares, Eloisa Yuste, and Cecilio Lopez-Galindez. 2015. "HIV-1 Dual Infected LTNP-EC Patients Developed an Unexpected Antibody Cross-Neutralizing Activity." Edited by Jean-Pierre Vartanian. *PLOS ONE* 10 (8): e0134054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134054>.
- Pilgrim, A. K., G. Pantaleo, O. J. Cohen, L. M. Fink, J. Y. Zhou, J. T. Zhou, D. P. Bolognesi, A. S. Fauci, and D. C. Montefiori. 1997. "Neutralizing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary Infection and Long-Term-Nonprogressive Infection." *The Journal of Infectious Diseases* 176 (4): 924–32. <https://doi.org/10.1086/516508>.
- Pitisuttithum, Punnee, Peter Gilbert, Marc Gurwith, William Heyward, Michael Martin, Fritz van Griensven, Dale Hu, Jordan W. Tappero, Kachit Choopanya, and Bangkok Vaccine Evaluation Group. 2006. "Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Efficacy Trial of a Bivalent Recombinant Glycoprotein 120 HIV-1 Vaccine among Injection Drug Users in Bangkok, Thailand." *The Journal of Infectious Diseases* 194 (12): 1661–71. <https://doi.org/10.1086/508748>.

Bibliographie

- Plantier, Jean-Christophe, Marie Leoz, Jonathan E. Dickerson, Fabienne De Oliveira, François Cordonnier, Véronique Lemée, Florence Damond, David L. Robertson, and François Simon. 2009. "A New Human Immunodeficiency Virus Derived from Gorillas." *Nature Medicine* 15 (8): 871.
- Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat. 1998. "Effects of CCR5 and CD4 Cell Surface Concentrations on Infections by Macrophagetropic Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of Virology* 72 (4): 2855–64.
- Pohlmeyer, Christopher W., Veronica D. Gonzalez, Alivelu Irrinki, Ricardo N. Ramirez, Li Li, Andrew Mulato, Jeffrey P. Murry, et al. 2019. "Identification of NK Cell Subpopulations That Differentiate HIV-Infected Subject Cohorts with Diverse Level of Virus Control." *Journal of Virology*, January. <https://doi.org/10.1128/JVI.01790-18>.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 1980. "Detection and Isolation of Type C Retrovirus Particles from Fresh and Cultured Lymphocytes of a Patient with Cutaneous T-Cell Lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (12): 7415–19.
- Prendergast, Andrew, Julia G. Prado, Yu-Hoi Kang, Fabian Chen, Lynn A. Riddell, Graz Luzzi, Philip Goulder, and Paul Klennerman. 2010. "HIV-1 Infection Is Characterized by Profound Depletion of CD161+ Th17 Cells and Gradual Decline in Regulatory T Cells." *AIDS (London, England)* 24 (4): 491–502. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283344895>.

R

- Ranasinghe, Srinika, Sam Cutler, Isaiah Davis, Richard Lu, Damien Z. Soghoian, Ying Qi, John Sidney, et al. 2013. "Association of HLA-DRB1-Restricted CD4⁺ T Cell Responses with HIV Immune Control." *Nature Medicine* 19 (7): 930–33. <https://doi.org/10.1038/nm.3229>.
- Ratner, Lee, William Haseltine, Roberto Patarca, Kenneth J. Livak, Bruno Starcich, Steven F. Josephs, Ellen R. Doran, et al. 1985. "Complete Nucleotide Sequence of the AIDS Virus, HTLV-III." *Nature* 313 (6000): 277–84. <https://doi.org/10.1038/313277a0>.
- Rausch, Jason W., and Stuart F. J. Le Grice. 2015. "HIV Rev Assembly on the Rev Response Element (RRE): A Structural Perspective." *Viruses* 7 (6): 3053–75. <https://doi.org/10.3390/v7062760>.
- Reeves, Jacqueline D., and Robert W. Doms. 2002. "Human Immunodeficiency Virus Type 2." *The Journal of General Virology* 83 (Pt 6): 1253–65. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-6-1253>.
- Rerks-Ngarm, Supachai, Punnee Pitisuttithum, Sorachai Nitayaphan, Jaranit Kaewkungwal, Joseph Chiu, Robert Paris, Nakorn Premisri, et al. 2009. "Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand." *The New England Journal of Medicine* 361 (23): 2209–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908492>.
- "Rey, 2017 Rapport d'activité, Le Trait d'Union 2016." n.d. Le Trait d'Union - Centre de Soins de l'Infection par le VIH. Accessed June 5, 2018. <https://www.docvadis.fr/medicale-a/>.
- Ribeiro, Carla M. S., Ramin Sarrami-Forooshani, Laurentia C. Setiawan, Esther M. Zijlstra-Willems, John L. van Hamme, Wikky Tigchelaar, Nicole N. van der Wel, Neeltje A. Kootstra, Sonja I. Gringhuis, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2016. "Receptor Usage Dictates HIV-1 Restriction by Human TRIM5α in Dendritic Cell Subsets." *Nature* 540 (7633): 448–52. <https://doi.org/10.1038/nature20567>.

- Rice, Andrew P., and Jason T. Kimata. 2015. "Subversion of Cell Cycle Regulatory Mechanisms by HIV." *Cell Host & Microbe* 17 (6): 736–40. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.010>.
- Richardson, Simone I., Amy W. Chung, Harini Natarajan, Batsirai Mabvakure, Nonhlanhla N. Mkhize, Nigel Garrett, Salim Abdool Karim, et al. 2018. "HIV-Specific Fc Effector Function Early in Infection Predicts the Development of Broadly Neutralizing Antibodies." *PLoS Pathogens* 14 (4): e1006987. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006987>.
- Ringear, Mathieu, Virginie Marchand, Etienne Decroly, Yuri Motorin, and Yamina Bennasser. 2019. "FTSJ3 Is an RNA 2'-O-Methyltransferase Recruited by HIV to Avoid Innate Immune Sensing." *Nature* 565 (7740): 500. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0841-4>.
- Rose, Kristine M, Mariana Marin, Susan L Kozak, and David Kabat. 2004. "The Viral Infectivity Factor (Vif) of HIV-1 Unveiled." *Trends in Molecular Medicine* 10 (6): 291–97. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.04.008>.
- Rouers, Angeline, Raphaël Jeger-Madiot, Arnaud Moris, and Stéphanie Graff-Dubois. 2017. "Lymphocytes T folliculaires helper et VIH - Unis pour le meilleur et pour le pire." *médecine/sciences* 33 (10): 878–86. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310020>.
- Rouers, Angeline, Jérôme Klingler, Bin Su, Assia Samri, Géraldine Laumond, Sophie Even, Véronique Avettand-Fenoel, et al. 2017. "HIV-Specific B Cell Frequency Correlates with Neutralization Breadth in Patients Naturally Controlling HIV-Infection." *EBioMedicine*, May. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.029>.
- Rowland-Jones, Sarah L. 2003. "Timeline: AIDS Pathogenesis: What Have Two Decades of HIV Research Taught Us?" *Nature Reviews. Immunology* 3 (4): 343–48. <https://doi.org/10.1038/nri1058>.
- Ruiz, María Julia, Yanina Ghiglione, Juliana Falivene, Natalia Laufer, María Pía Holgado, María Eugenia Socías, Pedro Cahn, et al. 2015. "Env-Specific IgA from Viremic HIV-Infected Subjects Compromises Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity." *Journal of Virology* 90 (2): 670–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.02363-15>.
- Rusert, Peter, Roger D. Kouyos, Claus Kadelka, Hanna Ebner, Merle Schanz, Michael Huber, Dominique L. Braun, et al. 2016. "Determinants of HIV-1 Broadly Neutralizing Antibody Induction." *Nature Medicine* 22 (11): 1260–67. <https://doi.org/10.1038/nm.4187>.

S

- Sacha, Jonah B., Juan P. Giraldo-Vela, Matthew B. Buechler, Mauricio A. Martins, Nicholas J. Maness, Chungwon Chung, Lyle T. Wallace, et al. 2009. "Gag- and Nef-Specific CD4+ T Cells Recognize and Inhibit SIV Replication in Infected Macrophages Early after Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (24): 9791–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813106106>.
- Sadanand, Saheli, Jishnu Das, Amy W. Chung, Matthew K. Schoen, Sophie Lane, Todd J. Suscovich, Hendrik Streeck, et al. 2018. "Temporal Variation in HIV-Specific IgG Subclass Antibodies during Acute Infection Differentiates Spontaneous Controllers from Chronic Progressors." *AIDS (London, England)* 32 (4): 443–50. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001716>.
- Sáez-Cirión, Asier, Charline Bacchus, Laurent Hocqueloux, Véronique Avettand-Fenoel, Isabelle Girault, Camille Lecuroux, Valerie Potard, et al. 2013. "Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early

Bibliographie

- Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study." *PLOS Pathog* 9 (3): e1003211. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003211>.
- Sáez-Cirión, Asier, Chiraz Hamimi, Anna Bergamaschi, Annie David, Pierre Versmisse, Adeline Mélard, Faroudy Boufassa, et al. 2011. "Restriction of HIV-1 Replication in Macrophages and CD4+ T Cells from HIV Controllers." *Blood* 118 (4): 955–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327106>.
- Sáez-Cirión, Asier, Christine Lacabartz, Olivier Lambotte, Pierre Versmisse, Alejandra Urrutia, Faroudy Boufassa, Françoise Barré-Sinoussi, et al. 2007. "HIV Controllers Exhibit Potent CD8 T Cell Capacity to Suppress HIV Infection Ex Vivo and Peculiar Cytotoxic T Lymphocyte Activation Phenotype." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (16): 6776–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611244104>.
- Sáez-Cirión, Asier, and Nicolas Manel. 2018. "Immune Responses to Retroviruses." *Annual Review of Immunology* 36: 193–220. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052155>.
- Sáez-Cirión, Asier, and Gianfranco Pancino. 2013. "HIV Controllers: A Genetically Determined or Inducible Phenotype?" *Immunological Reviews* 254 (1): 281–94. <https://doi.org/10.1111/imr.12076>.
- Sáez-Cirión, Asier, Martine Sinet, So Youn Shin, Alejandra Urrutia, Pierre Versmisse, Christine Lacabartz, Faroudy Boufassa, et al. 2009. "Heterogeneity in HIV Suppression by CD8 T Cells from HIV Controllers: Association with Gag-Specific CD8 T Cell Responses." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (12): 7828–37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803928>.
- Sajadi, Mohammad M., Yongjun Guan, Anthony L. DeVico, Michael S. Seaman, Mian Hossain, George K. Lewis, and Robert R. Redfield. 2011. "Correlation between Circulating HIV-1 RNA and Broad HIV-1 Neutralizing Antibody Activity." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* (1999) 57 (1): 9–15. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182100c1b>.
- Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, et al. 1996. "Resistance to HIV-1 Infection in Caucasian Individuals Bearing Mutant Alleles of the CCR-5 Chemokine Receptor Gene." *Nature* 382 (6593): 722–25. <https://doi.org/10.1038/382722a0>.
- Santos da Silva, Eveline, Martin Mulinge, and Danielle Perez Bercoff. 2013. "The Frantic Play of the Concealed HIV Envelope Cytoplasmic Tail." *Retrovirology* 10 (May): 54. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-54>.
- Santos, Steven, Yuri Obukhov, Sergei Nekhai, Michael Bukrinsky, and Sergey Iordanskiy. 2012. "Virus-Producing Cells Determine the Host Protein Profiles of HIV-1 Virion Cores." *Retrovirology* 9: 65.
- Sather, D. Noah, Jakob Armann, Lance K. Ching, Angeliki Mavrantoni, George Sellhorn, Zachary Caldwell, Xuesong Yu, et al. 2009. "Factors Associated with the Development of Cross-Reactive Neutralizing Antibodies during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection." *Journal of Virology* 83 (2): 757–69. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-08>.
- Saxena, Reshu, Umeshkumar Vekariya, and Rajkamal Tripathi. 2019. "HIV-1 Nef and Host Proteome Analysis: Current Perspective." *Life Sciences* 219 (February): 322–28. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.025>.

- Schröder, Astrid R. W., Paul Shinn, Huaming Chen, Charles Berry, Joseph R. Ecker, and Frederic Bushman. 2002. "HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots." *Cell* 110 (4): 521–29.
- Shiver, John W., Tong-Ming Fu, Ling Chen, Danilo R. Casimiro, Mary-Ellen Davies, Robert K. Evans, Zhi-Qiang Zhang, et al. 2002. "Replication-Incompetent Adenoviral Vaccine Vector Elicits Effective Anti-Immunodeficiency-Virus Immunity." *Nature* 415 (6869): 331–35. <https://doi.org/10.1038/415331a>.
- Simek, Melissa D., Wasima Rida, Frances H. Priddy, Pham Pung, Emily Carrow, Dagna S. Laufer, Jennifer K. Lehrman, et al. 2009. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Neutralizers: Individuals with Broad and Potent Neutralizing Activity Identified by Using a High-Throughput Neutralization Assay Together with an Analytical Selection Algorithm." *Journal of Virology* 83 (14): 7337–48. <https://doi.org/10.1128/JVI.00110-09>.
- Simmons, G., D. Wilkinson, J. D. Reeves, M. T. Dittmar, S. Beddows, J. Weber, G. Carnegie, et al. 1996. "Primary, Syncytium-Inducing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates Are Dual-Tropic and Most Can Use Either Lestr or CCR5 as Coreceptors for Virus Entry." *Journal of Virology* 70 (12): 8355–60.
- Sleasman, John W., and Maureen M. Goodenow. 2003. "13. HIV-1 Infection." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111 (2 Suppl): S582-592.
- Smyth, Redmond P., Miles P. Davenport, and Johnson Mak. 2012. "The Origin of Genetic Diversity in HIV-1." *Virus Research* 169 (2): 415–29. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.015>.
- Soghoian, Damien Z., Heiko Jessen, Michael Flanders, Kailan Sierra-Davidson, Sam Cutler, Thomas Pertel, Srinika Ranasinghe, et al. 2012. "HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cell Responses during Acute HIV Infection Predict Disease Outcome." *Science Translational Medicine* 4 (123): 123ra25. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003165>.
- Sok, Devin, and Dennis R. Burton. 2018. "Recent Progress in Broadly Neutralizing Antibodies to HIV." *Nature Immunology* 19 (11): 1179–88. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0235-7>.
- Speck, R. F., K. Wehrly, E. J. Platt, R. E. Atchison, I. F. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, and M. A. Goldsmith. 1997. "Selective Employment of Chemokine Receptors as Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptors Determined by Individual Amino Acids within the Envelope V3 Loop." *Journal of Virology* 71 (9): 7136–39.
- Stanfield-Oakley, S.A., J. Pollara, A. deCamp, B. Korber, C. LaBranche, C. Ochsenbauer, D. Montefiori, and G. Ferrari. n.d. "Identification of a Panel of IMC to Define Breadth and Potency of ADCC Responses." In: Keystone Symposia X8. Olympic Valley, CA (2016).
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, and R. C. Gallo. 1986. "Identification and Characterization of Conserved and Variable Regions in the Envelope Gene of HTLV-III/LAV, the Retrovirus of AIDS." *Cell* 45 (5): 637–48.
- Stoiber, Heribert, Anna Soederholm, Doris Wilflingseder, Simone Gusenbauer, Alexander Hildgartner, and Manfred P. Dierich. 2008. "Complement and Antibodies: A Dangerous Liaison in HIV Infection?" *Vaccine* 26 Suppl 8 (December): I79-85.
- Strain, M. C., H. F. Günthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, D. M. Smith, A. J. Leigh-Brown, T. R. Macaranas, et al. 2003. "Heterogeneous Clearance Rates of Long-Lived Lymphocytes Infected with HIV: Intrinsic Stability Predicts Lifelong Persistence." *Proceedings of the*

Bibliographie

National Academy of Sciences of the United States of America 100 (8): 4819–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0736332100>.

Sundquist, Wesley I., and Hans-Georg Kräusslich. 2012. "HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7): a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>.

T

Tebit, Denis M., and Eric J. Arts. 2011. "Tracking a Century of Global Expansion and Evolution of HIV to Drive Understanding and to Combat Disease." *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (1): 45–56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70186-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70186-9).

Temin, H M, and S Mizutani. 1992. "RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. 1970." *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 51–56.

"Testing | HIV Basics | HIV/AIDS | CDC." 2017. October 3, 2017. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/testing.html>.

Tomaras, Georgia D., Nicole L. Yates, Pinghuang Liu, Li Qin, Genevieve G. Fouda, Leslie L. Chavez, Allan C. Decamp, et al. 2008. "Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-Gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia." *Journal of Virology* 82 (24): 12449–63. <https://doi.org/10.1128/JVI.01708-08>.

Trkola, Alexandra, Jamie Matthews, Cynthia Gordon, Tom Ketas, and John P. Moore. 1999. "A Cell Line-Based Neutralization Assay for Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates That Use Either the CCR5 or the CXCR4 Coreceptor." *Journal of Virology* 73 (11): 8966–74.

Tuero, Iskra, Venkatramanan Mohanram, Thomas Musich, Leia Miller, Diego A. Vargas-Inchaustegui, Thorsten Demberg, David Venzon, et al. 2015. "Mucosal B Cells Are Associated with Delayed SIV Acquisition in Vaccinated Female but Not Male Rhesus Macaques Following SIVmac251 Rectal Challenge." *PLoS Pathogens* 11 (8): e1005101. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005101>.

V

Valentin, Antonio, and George N. Pavlakis. 2003. "Natural Killer Cells Are Persistently Infected and Resistant to Direct Killing by HIV-1." *Anticancer Research* 23 (3A): 2071–75.

Van Damme, Lut, Gita Ramjee, Michel Alary, Bea Vuylsteke, Verapol Chandeying, Helen Rees, Pachara Sirivongrangson, et al. 2002. "Effectiveness of COL-1492, a Nonoxynol-9 Vaginal Gel, on HIV-1 Transmission in Female Sex Workers: A Randomised Controlled Trial." *Lancet (London, England)* 360 (9338): 971–77.

Van Damme, Nanette, and John Guatelli. 2008. "HIV-1 Vpu Inhibits Accumulation of the Envelope Glycoprotein within Clathrin-Coated, Gag-Containing Endosomes." *Cellular Microbiology* 10 (5): 1040–57. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01101.x>.

Vidarsson, Gestur, Gillian Dekkers, and Theo Rispens. 2014. "IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions." *Frontiers in Immunology* 5 (October). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.

Vingert, Benoît, Daniela Benati, Olivier Lambotte, Pierre de Truchis, Laurence Slama, Patricia Jeannin, Moran Galperin, et al. 2012. "HIV Controllers Maintain a Population of Highly

Efficient Th1 Effector Cells in Contrast to Patients Treated in the Long Term.” *Journal of Virology* 86 (19): 10661–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.00056-12>.

Vingert, Benoît, Santiago Perez-Patrigéon, Patricia Jeannin, Olivier Lambotte, Faroudy Boufassa, Fabrice Lemaître, William W. Kwok, et al. 2010. “HIV Controller CD4+ T Cells Respond to Minimal Amounts of Gag Antigen Due to High TCR Avidity.” *PLoS Pathogens* 6 (2): e1000780. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000780>.

W

Walker, Laura M., Michael Huber, Katie J. Doores, Emilia Falkowska, Robert Pejchal, Jean-Philippe Julien, Sheng-Kai Wang, et al. 2011. “Broad Neutralization Coverage of HIV by Multiple Highly Potent Antibodies.” *Nature* 477 (7365): 466–70. <https://doi.org/10.1038/nature10373>.

Wei, Xiping, Julie M. Decker, Shuyi Wang, Huxiong Hui, John C. Kappes, Xiaoyun Wu, Jesus F. Salazar-Gonzalez, et al. 2003. “Antibody Neutralization and Escape by HIV-1.” *Nature* 422 (6929): 307–12. <https://doi.org/10.1038/nature01470>.

Wilén, Craig B., John C. Tilton, and Robert W. Doms. 2012. “HIV: Cell Binding and Entry.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>.

Witte, Lot de, Alexey Nabatov, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2008. “Distinct Roles for DC-SIGN+-Dendritic Cells and Langerhans Cells in HIV-1 Transmission.” *Trends in Molecular Medicine* 14 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.11.001>.

Wu, Li, and Vineet N. KewalRamani. 2006. “Dendritic-Cell Interactions with HIV: Infection and Viral Dissemination.” *Nature Reviews. Immunology* 6 (11): 859–68. <https://doi.org/10.1038/nri1960>.

Wyatt, R., and J. Sodroski. 1998. “The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens.” *Science (New York, N.Y.)* 280 (5371): 1884–88.

Y

Yates, Nicole L., Hua-Xin Liao, Youyi Fong, Allan deCamp, Nathan A. Vandergrift, William T. Williams, S. Munir Alam, et al. 2014. “Vaccine-Induced Env V1-V2 IgG3 Correlates with Lower HIV-1 Infection Risk and Declines Soon after Vaccination.” *Science Translational Medicine* 6 (228): 228ra39. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007730>.

Yu, Lei, and Yongjun Guan. 2014. “Immunologic Basis for Long HCDR3s in Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV-1.” *Frontiers in Immunology* 5 (June). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00250>.

Z

Zhang, Hui, Bin Yang, Roger J. Pomerantz, Chune Zhang, Shyamala C. Arunachalam, and Ling Gao. 2003. “The Cytidine Deaminase CEM15 Induces Hypermutation in Newly Synthesized HIV-1 DNA.” *Nature* 424 (6944): 94–98. <https://doi.org/10.1038/nature01707>.

Zhang, Ming, Brian Gaschen, Wendy Blay, Brian Foley, Nancy Haigwood, Carla Kuiken, and Bette Korber. 2004. “Tracking Global Patterns of N-Linked Glycosylation Site Variation in Highly Variable Viral Glycoproteins: HIV, SIV, and HCV Envelopes and Influenza

- Hemagglutinin." *Glycobiology* 14 (12): 1229–46.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwh106>.
- Zhou, Tongqing, Anqi Zheng, Ulrich Baxa, Gwo-Yu Chuang, Ivelin S. Georgiev, Rui Kong, Sijy O'Dell, et al. 2018. "A Neutralizing Antibody Recognizing Primarily N-Linked Glycan Targets the Silent Face of the HIV Envelope." *Immunity* 48 (3): 500-513.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.013>.
- Zhu, Jinfang, Hidehiro Yamane, and William E. Paul. 2010. "Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (*)." *Annual Review of Immunology* 28: 445–89.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>.

Annexes

Annexes

Publication 4

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients
contrôleurs du VIH

Annexes

Des anticorps non neutralisants ciblant le domaine V1V2 du VIH démontrent de fortes activités de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

Non-neutralizing Antibodies Targeting the V1V2 Domain of HIV Exhibit Strong Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxic Activity

Luzia M. Mayr, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Géraldine Laumond, Jérôme Klingler, Camille Ducloy, Seiamak Bahram, Suzan Zolla-Pazner, Christiane Moog

Scientific Reports, 2017

255

L'essai RV144 et plusieurs modèles de primates ont montré que l'induction d'anticorps non neutralisants inhibiteurs dirigés contre la boucle V1/V2 de la gp120 était corrélée avec une diminution du risque d'infection. Cette diminution du risque d'infection pourrait être due à l'activité ADCC de ces anticorps non neutralisants. Cependant, la complexité de cette activité suggère une difficulté dans la mise en place de modèle *in vitro* reflétant la meilleure corrélation avec les études *in vivo*.

Dans cette étude, nous avons analysé l'activité ADCC de différents anticorps neutralisants et d'anticorps non neutralisants dirigés contre la boucle V1/V2 isolés à partir de sérums de patients infectés. Le test ADCC utilise comme cellules effectrices des cellules NK et comme cellules cibles des lymphocytes T CD4⁺ primaires infectées avec des isolats primaires ou des virus « transmis/fondateurs ». Ce test nous permet donc de nous rapprocher des conditions physiologiques de lyse de cellules *in vivo*. L'activité ADCC induite par les anticorps dirigés contre V1/V2 est comparée à l'activité ADCC induite par d'autres anticorps neutralisants ciblant différents épitopes viraux.

Dans ces conditions de culture, nous détectons une activité ADCC élevée en présence d'anticorps non neutralisants dirigés contre la boucle V2. Cette étude est la première à mettre en évidence une activité ADCC en présence d'anticorps non neutralisants dirigés contre la boucle V2 de la gp120. Ces résultats démontrent le rôle potentiel des anticorps dirigés contre la boucle V1/V2 dans l'activité ADCC.

Cette étude a essentiellement été menée par la post-doctorante L. Mayr dans notre laboratoire. Dans cette étude, j'ai isolé des cellules primaires et produit différents stocks de virus qui ont permis la réalisation des expériences.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Non-neutralizing Antibodies Targeting the V1V2 Domain of HIV Exhibit Strong Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxic Activity

Luzia M. Mayr¹, Thomas Decoville^{1,3}, Sylvie Schmidt¹, Géraldine Laumond¹, Jérôme Klingler¹, Camille Ducloy^{1,3}, Seiamak Bahram^{1,3}, Susan Zolla-Pazner^{1,2} & Christiane Moog^{1,3}

The development of an effective vaccine against HIV-1 has proven to be challenging. Broadly neutralizing antibodies (bNAbs), whilst exhibiting neutralization breadth and potency, are elicited only in a small subset of infected individuals and have yet to be induced by vaccination. Case-control studies of RV144 identified an inverse correlation of HIV-1 infection risk with antibodies (Abs) to the V1V2 region of gp120 with high antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity. The neutralizing activity of Abs was not found to contribute to this protective outcome. Using primary effector and target cells and primary virus isolates, we studied the ADCC profile of different monoclonal Abs targeting the V1V2 loop of gp120 that had low or no neutralizing activity. We compared their ADCC activity to some bNAbs targeting different regions of gp120. We found that mAbs targeting the V1V2 domain induce up to 60% NK cell mediated lysis of HIV-1 infected PBMCs in a physiologically relevant ADCC model, highlighting the interest in inducing such Abs in future HIV vaccine trials. Our data also suggest that in addition to neutralization, lysis of infected cells by Abs can effectively participate in HIV protection, as suggested by the RV144 immune correlate analysis.

A strong antibody (Ab) response directed against gp120 and gp41 envelope proteins is mounted in essentially all HIV-1 infected individuals. However, these Abs have limited neutralization capacity against the constantly mutating virus. Indeed, only a small subset of infected subjects produce broadly neutralizing antibodies (bNAbs) that possess neutralization breadth and potency against different HIV-1 subtypes^{1,2}. The monoclonal bNAbs generated from these patients however display special features such as high rates of somatic mutation and long complementary-determining region 3 (CDR3) sequences, making them difficult to be induced by vaccination.

Follow-up analysis of the immune correlates of RV144, the Thai HIV-1 vaccine trial - which reported modest protection (estimated 31.2% vaccine efficacy) - showed a correlation in vaccinees between reduced infection rates and high levels of Abs targeting the V1/V2 region of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Further analyses indicated that, in the presence of low IgA Env Abs, Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) inversely correlated with a reduced rate of infection^{3,4}. Neutralizing activity did not contribute to the protective effect of RV144⁵.

The V1V2 domain is immunogenic and Abs targeting this region are induced in most HIV-1 infected patients⁶. It is located at the distal apex of the trimeric HIV-1 Env spike, where it is accessible to Abs^{7,8}. The region assumes a five-stranded beta barrel structure and contains the LDV/I motif that has been shown to bind to the $\alpha 4\beta 7$ integrin, important for T cell homing^{9,10}. Interestingly, $\alpha 4\beta 7$ mAb treatment of macaques that lead to sustained SIV virological control also promoted V2 antibody responses, recognizing the same region identified in a sieve analysis for immune correlates of reduced risk in the RV144 vaccine trial¹¹.

¹INSERM U1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ²Division of Infectious Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA. ³Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M. (email: c.moog@unistra.fr)

A set of mAbs, termed V2i mAbs, was isolated from HIV-1 clade B-infected patients and recognize a conformation-dependent epitope surrounding the $\alpha 4\beta 7$ integrin binding site of the V1V2 domain^{12–15}. These V2i mAbs display numerous physicochemical similarities to the Abs elicited in RV144 such as weak neutralizing activity and overlapping epitope regions. However, their ADCC activity was not yet assessed. Abs targeting this region are commonly induced by HIV-1 infection and are also elicited by vaccination^{3,4,16,17}. This makes them a promising tool for HIV-1 vaccine research.

ADCC activity is characterized by the interaction of the Fc region of an immunoglobulin, bound via its Fab part to Env on infected cells, and to Fc receptors expressed on the surface of effector cells, such as NK cells. This triggers the release of cytotoxic granules containing perforin and granzymes, leading to the death of the antibody-bound infected target cell. In this regard, ADCC is a complex multistep process. Several user-optimized assays have been developed with different target cells, effector cells and end-point read-outs to detect ADCC *in vitro*, but it is not known which assay shows the best correlation with *in vivo* protection.

Noteworthy, assays using HIV-1 infected cells showed that CD4 binding modifies the expression of ADCC epitopes¹⁸ and lysis of primary HIV-infected T cells was shown to be enhanced by the addition of CD4 mimetics¹⁹. These results imply that some HIV epitopes may be masked on infected cells, therefore allowing the virus to escape from ADCC in physiologically relevant *in vivo* situations.

Although difficult to compare to each other, these assays have shown that ADCC may effectively participate in protection against HIV. In addition to the RV144 immune correlate analysis, high levels of ADCC Abs have been associated with slow disease progression in both HIV and simian immunodeficiency virus (SIV) models^{20–22}. Local application of Abs directed against the principal immunodominant domain (PID) of gp41 and exhibiting ADCC and Fc-mediated inhibitory activities *in vitro* were shown to decrease the viral load set point and the number of transmitted/founder viruses in macaques challenged experimentally^{23,24}. ADCC activity was also significantly higher in HIV elite controllers, a group of rare HIV-1 infected patients who were able to maintain viremia below detectable limits²⁵. In the context of mother-infant transmission, high ADCC activity in maternal breast milk reduced HIV infection of the infant via breastfeeding and decreased the mortality risk of the infected infants^{26,27}. These and additional studies have pointed towards ADCC as an important mechanism to target HIV-1 *in vivo*^{28–30}.

Recently, Bruel *et al.* reported a lack of ADCC activity in non-neutralizing anti-HIV-1 Abs, using re-activated T cells from HIV-1 infected patients. The study included non-neutralizing Abs targeting the V3 crown, CD4 binding site, and the PID site of gp41. Non-neutralizing Abs targeting V2 epitopes were not tested³¹.

The present study was performed to assess and compare the ADCC capacity of mAbs using an assay that directly measures the lysis of infected primary CD4 T cells and is therefore physiologically more relevant than assays using cell lines. Abs to different regions of gp120 were included, but the focus was on anti-V1V2 mAbs, isolated from HIV-1 infected patients and similar to Abs induced by RV144, with no or low neutralizing activity. In addition, other anti-V1/V2 Abs and well-characterized bNAbs were used. Our data suggest that mAbs targeting the V1V2 domain of gp120 show exceptional ADCC activity using this assay and are highly relevant Abs for inducing ADCC activity.

Results

Non-neutralizing V2i mAbs induce stronger NK cell-mediated lysis of HIV-1_{SP162} infected CD4 T cells than a panel of three broadly neutralizing mAbs. The ADCC assay that we perform uses primary CD4 T cells infected with HIV-1 isolates produced by primary PBMCs (target cells) and autologous purified NK cells (effector cells). We require a minimum infection rate of 15% for the target cells and record the decrease of infected cells over 4 hrs, hence measuring the direct lysis of infected cells in the presence of Abs (Fig. 1A). All measurements were performed with at least 2 different donor cells to ensure reproducibility. This assay gives a highly physiologically relevant reading of the decrease of infected primary cells by Abs.

An initial titration of the Abs was carried out. We measured a dose response for all mAbs and selected the concentration that induced the highest NK cell mediated killing of HIV-1_{SP162}-infected cells (Fig. 1B). Using this concentration (5 μ g/ml) we then compared the ADCC activity of several bNAbs with mAbs with no or low neutralizing activity (here referred to as non-neutralizers). The mAbs used target several gp120 epitopes as indicated in Table 1.

We found that the non-neutralizing mAbs directed against the V2i epitope and the gp41 principal immunodominant domain (PID) were more potent in inducing NK cell mediated killing of HIV-1_{SP162}-infected cells compared to the broadly neutralizing mAbs tested (Fig. 2A). Notably, the V2i mAbs reached high levels of ADCC, achieving levels of p24+ cell decrease of up to 55–65% for non-neutralizing mAbs 697D and 830A. As level of ADCC activity varied according to the primary donor cell used, we repeated the ADCC experiment 6 times with different PBMC donors. The mean of decrease of p24+ cells was 45% for mAb 697D and 33% for mAb 830A. The gp41 PID mAb 7B2, which is also non-neutralizing, achieved a maximum ADCC level of 38% and a mean of 29% when tested in 5 independent experiments with different PBMC donors. There was no statistically significant difference in the ADCC levels of these 3 non-neutralizers (Fig. 2A).

In contrast, the ADCC activity of the bNAbs reached maximum levels of 34%, 23%, and 16% for 3BNC117, 10-1074, and 10E8, respectively (Fig. 2A). They were each tested in 5–6 different ADCC experiments and the mean reduction in p24+ cells was 23%, 14%, and 10% for 3BNC117, 10-1074, and 10E8, respectively. This was significantly lower than the ADCC activity displayed by 697D. Finally, mAb 3BNC176, targeting an interprotomer epitope of gp41, displayed no ADCC.

When comparing the reduction in p24+ cells induced by the 2 mAbs targeting the V2i epitope to the reduction achieved by the 3 bNAbs we found that the V2i mAbs were significantly better at inducing ADCC ($p < 0,0001$) on SP162-infected cells. The mean p24+ cell decrease was more than 2-fold higher with the V2i mAbs (39% for V2i mAbs vs, 16% for bNAbs) (Fig. 2B).

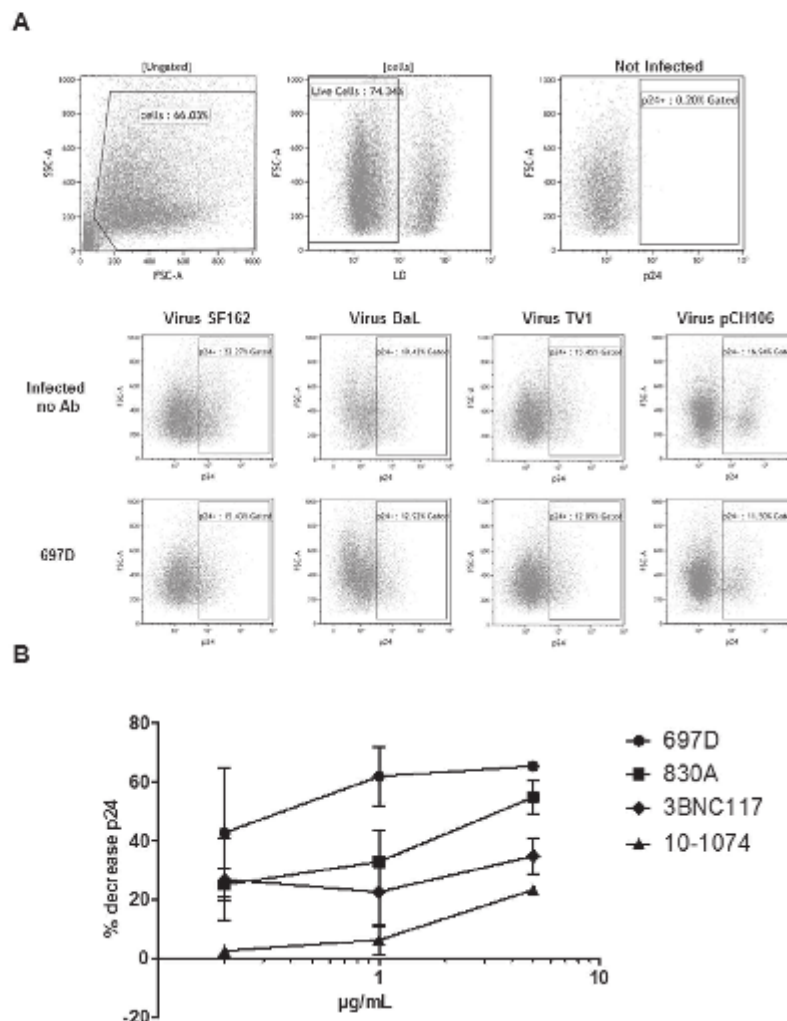


Figure 1. Flow cytometry data of three ADCC experiments. The infected cells were stained with a Live/Dead marker to exclude the dead cells from the analysis. After permeabilization, cells were stained for intracellular p24. The addition of 5 µg/ml of each mAb induced the lysis of infected cells, visible in the decrease in p24 positive cells. Data for 3 independent experiments with 3 different donor cells infected with different HIV subtypes are shown. (A) A dose-response curve is shown for mAbs to determine the best concentration for inducing NK cell mediated killing of HIV-1_{gp120}-infected cells. MAb were used at 5 - 1 - and 0.2 µg/ml and were specific for V2i (697D and 830A), CD4bs (3BNC117) and the V3-glycan (10-1074). The mean with SEM of one experiment in duplicates is shown (B).

V2i mAbs induce cross-clade NK cell mediated lysis. The high ADCC activity of the V2i mAbs demonstrated in our experimental conditions encouraged us to take a closer look at a panel of V2i mAbs (Table 1). We have previously shown that these V2i mAbs have little neutralizing capacity¹². To further assess mAbs that target other epitopes in V2, we included in the study the V2p mAbs CH58 and CH59, isolated from RV144 vaccinees receiving subtype A/E and B gp120s, which had been shown to have weak and narrow neutralizing activity³² and therefore are categorized here as non-neutralizers (Table 1). Monoclonal Ab PC9, a V2q mAb that was isolated

mAb	Specificity	Source	Neutralizing Activity	Reference	Derivation
697-D	V2i	SZP	—	15	hybridoma
830A	V2i	SZP	—	50	hybridoma
1361	V2i	SZP	—	51	hybridoma
1393A	V2i	SZP	—	50	hybridoma
2158	V2i	SZP	—	49	hybridoma
2297	V2i	SZP	—	14	hybridoma
CH58	V2p	XPK	—	38	recombinant
CH59	V2p	XPK	—	38	recombinant
PG9	V2q	HIV Rep	++	33	recombinant
7B2	gp41 (cluster I PID)	HIV Rep	—	52	hybridoma
3BNC117	CD4bs	HIV Rep	+++	53	recombinant
10-1074	V3-glycan	HM	+++	54	recombinant
10E8	gp41 (MPER)	HIV Rep	++	48	recombinant
3BNC176	gp41 (interprotomer)	HM	+/-	55	recombinant

Table 1. Human mAbs used. SZP: Susan Zola-Pazner, XPK: Xiangpeng Kong, HIV Rep: NIH HIV Repository, HM: Hugo Mouquet.

from a clade A donor, recognizes a quaternary epitope that requires the presence of the N160 glycan on gp120 and is a potent and broad neutralizer³³ (Table 1).

All six tested V2i mAbs showed strong ADCC activity against SF162, as did the two V2p mAbs CH58 and CH59. Monoclonal Ab 697D induced the strongest decrease in intracellular p24+ cells (45%), followed by 830A (33%) and 1391 A (28%). CH58 and CH59 induced a 30% and 28% decrease in p24+ cells, respectively. PG9 did not induce ADCC against SF162 infected cells since the SF162 Env lacks the required N160 glycan^{24,35} (Fig. 3A). Furthermore, V2i mAbs were able to lyse CD4 T target cells infected with the clade B BaL virus, although with slightly lower ADCC activity (range of 4% to 33% of intracellular p24+ cell decrease). Both V2p mAbs CH58 and CH59 also strongly induced NK cell mediated killing of BaL infected cells with a mean 25% and 44% reduction in p24+ cells, respectively. PG9 displayed the strongest ADCC capacity against BaL with more than 50% of p24+ cell reduction (Fig. 3B). Low levels of ADCC were recorded when the cells were infected with TV1, a clade C virus and Bx08, a clade B virus, both classified as Tier 2 for neutralization. Against TV1, the maximum ADCC activity by V2i mAbs was detected with mAbs 830A and 697D, achieving a decrease in p24+ cell of 18% and 17%, respectively. V2p mAb CH58 induced ADCC levels of 8% whilst CH59 did not display ADCC activity against TV1 infected target cells. The V2q mAb PG9 performed very well in inducing ADCC against this subtype C, Tier 2 primary isolate with a mean of 30% reduction of p24+ cells (Fig. 3C). Similar levels of ADCC were achieved against Bx08, with maximum ADCC levels reaching and 19% (PG9 and 697D) (Fig. 3D). In addition, we also tested two Transmitted/Founder (T/F) viruses: all of the V2i mAbs exhibited ADCC activity against pREJO, with means ranging from 23% (697D) to 13% (1393A and 2158). Similar ADCC levels were reached by the neutralizing Ab PG9 that induced a mean 17% decrease in p24+ cells (Fig. 3E). 697D showed an ADCC activity of 29% using T/F virus pCH106, compared to 21% for PG9 (Fig. 3F).

Overall, the V2 mAbs consistently induced NK cell mediated killing of primary cells infected with a variety of different viruses.

Binding to infected cells is necessary but not sufficient for ADCC activity. Abs need to bind to infected cells in order to carry out ADCC. We therefore measured the capacity of Abs to bind p24+ infected cells. V2i mAbs were able to bind p24+ pREJO-infected cells at levels ranging between 12% and 18%. This suggests that V2 epitopes are expressed on primary infected cells. However, this binding was less efficient than that observed with some bNAbs, which reached levels of up to 66% (Fig. 4A). Moreover, the binding capacity of mAbs to infected cells did not strongly correlate with their ADCC activity ($p = 0.0171$) (Fig. 4B). Indeed, binding is required but not sufficient to carry out the killing of infected cells and the triggering of additional steps via the Fc domain is necessary to induce ADCC.

Discussion

This is the first report showing that non-neutralizing anti-V2 mAbs elicited in HIV-1 infected patients have strong ADCC activity. Cross-reactive ADCC capacity was observed for four subtype B and C primary isolates (SF162, BaL, Bx08, and TV1) and two subtype B Transmitted Founder infectious molecular clones (pREJO, pCH106).

Abs displaying ADCC activity have to recognize and bind infected cells via their Fab fragments. Indeed, we found that anti-V2 mAbs bind to the V2 epitopes displayed on the surface of infected cells. However, the precise accessibility of V2 epitopes required for binding to infected cells was not determined. It has been suggested that "transitional epitopes" emerge on the surface of infected cells during conformational rearrangement^{12,36}. Moreover, epitopes may vary according to their stage of infection (early infection versus latently infected cells, cells covered with virus particles versus cells in the course of virus budding). Binding of CD4 was also shown to downregulate the expression of certain epitopes. Thus, the nature of the epitopes of the viral envelope glycoproteins exposed on the surface of these infected cells requires further investigation. We suggest that the V2 loop

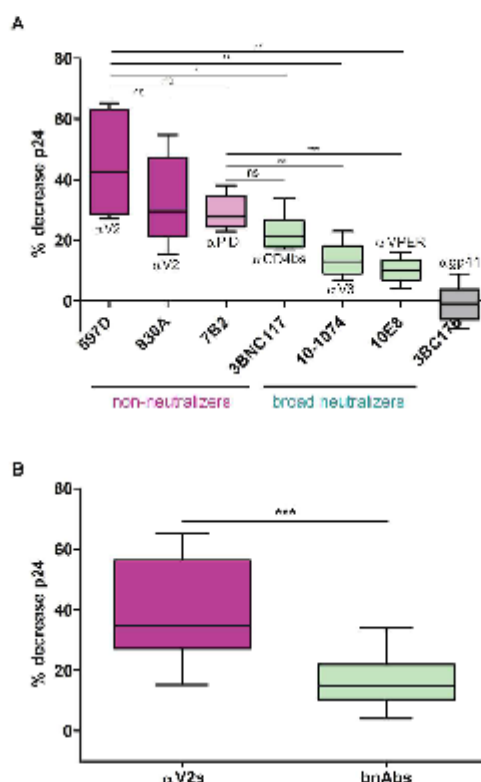


Figure 2. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) with enriched primary CD4 T cells infected with HIV-1_{SP2.2}. (A) ADCC activity of a set of mAbs was analyzed using 5 µg/ml of each mAb, using autologous NK cells as effector cells (E/T ratio = 1:1). A minimum of 5 different donor cells was tested per mAb. The percentage of target cell lysis (% decrease p24) was normalized to control wells without mAbs using the following formula: ((%p24 infected target cells with effectors – %p24 infected target cells with effectors and mAb) / %p24 infected targets with effector cells) × 100. (B) Pooled ADCC results of mAbs 697D and 830A (V2s) and 3BC117, 10-1074, and 10E8 (bnAbs). A two-tailed unpaired t-test was used for statistical analyses.

epitopes remain accessible on infected primary cells and that Abs targeting these epitopes are therefore highly relevant for ADCC activity under physiological conditions.

Previously, mAbs CH58 and CH59 were shown to induce ADCC using an NK cell line as effectors and a T cell line (CEM) infected with the IMC AE.CM235, the same subtype as the immunogen used for immunization^{32,37,38}. Here we show that CH58 and CH59 mAbs also display ADCC activity against SF162 and BaL infected primary cells.

The reported ADCC activity of mAb PG9 is contradictory depending on the assay used. With primary cells and primary BaL and TV1 virus, we detected high ADCC activity of PG9. Previously, no ADCC was observed using this mAb with the HIV-1_{JR-CSF}-infected CEM.NKR.CCR5 cell line and primary NK effector cells whilst others reported ADCC when CEM.NKR.CCR5 cells infected with HIV-1_{NEA-3} and HIV-1_{JR-FL} and an NK cell line expressing human FcγRIIIA was used as effector cells. The binding of the Fc domain of PG9 and other Abs to the FcR on the surface of different effector cells may explain the distinct results^{39,40}.

Abs have to capture effector cells via their Fc domain to trigger the ADCC process. Huang *et al.* recently showed that the mAb b12, mutated in the Fc domain to modify its Fc binding capacity, displayed distinct ADCC, or phagocytic functions⁴¹. These results firmly demonstrate that binding to the Fc domain is decisive for Fc-mediated functions. In this regard, binding to the tip of the envelope trimeric spike, where V1/V2 epitopes are located, may facilitate binding of the effector cell via the Fc domain of the Ab.

Noteworthy, in our study, the binding of the V1/V2 Abs did not strongly correlate with cell lysis implying that the Fc domain participates in induction of lysis. All V2i mAbs used here are IgG1, except for 830A, which

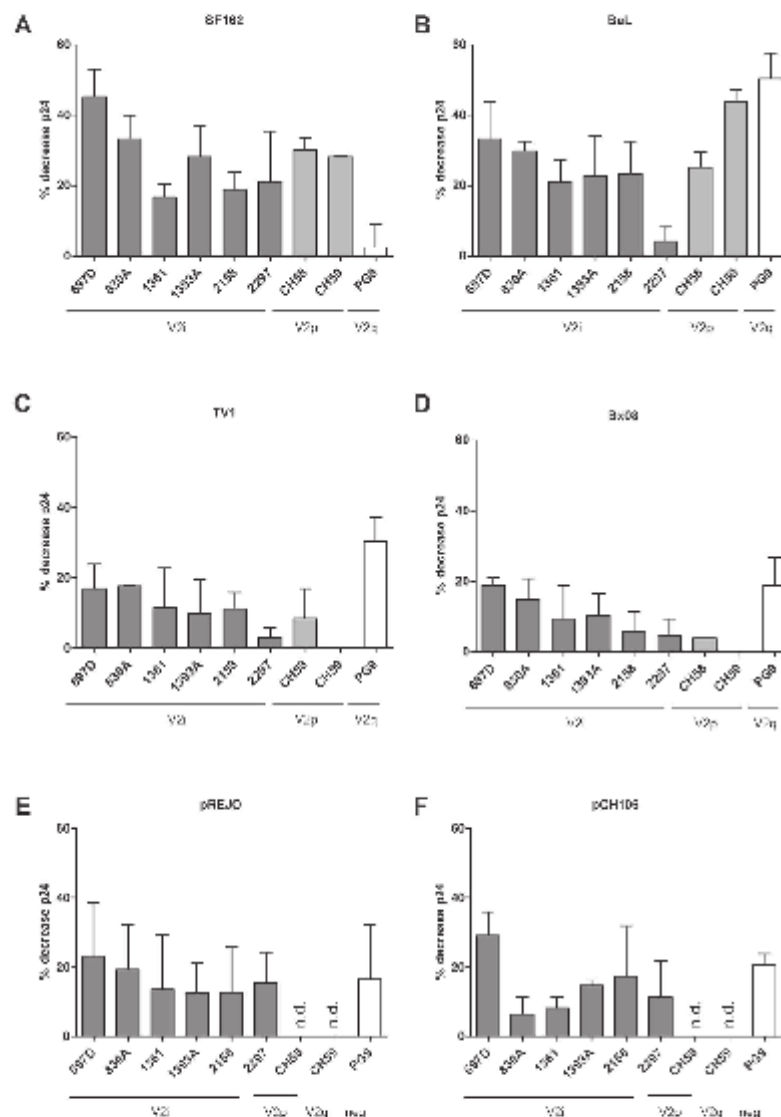


Figure 3. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) on enriched primary CD4 T cells infected with SF162 (A), BaL (B), TV1 (C), Bx08 (D), pREJO (E), or pCH106 (F). ADCC activity of mAbs targeting the V2 region of gp120 was analyzed using 5 µg/ml of each mAb, using autologous NK cells as effector cells (E/T ratio = 1:1). The mean of 2–3 independent experiments is shown with SEM. The percentage of target cell lysis was normalized to control wells without mAbs using the following formula: ((%p24 infected target cells with effectors – %p24 infected target cells with effectors and mAb) / %p24 infected targets with effector cells) × 100.

is IgG3. The mAbs tested herein were both recombinant and hybridoma-derived; the Fc domain is that of the Ab from the infected patients for the V2i mAbs but recombinantly engineered to be IgG1 for the bNABs^{14,42}. Therefore, the specificity and derivation of the Abs studied here differed from those examined by Bruel *et al.*³¹.

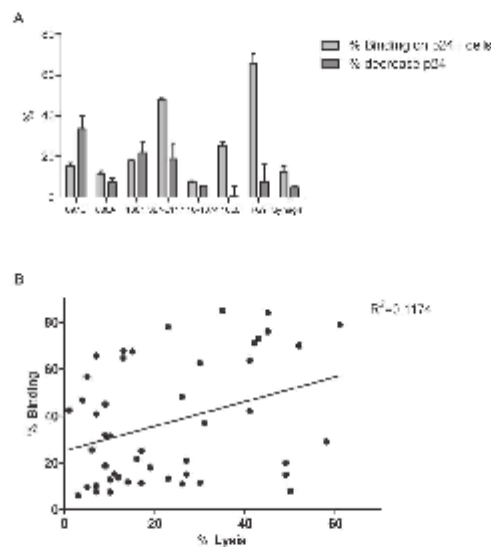


Figure 4. Binding of mAbs to enriched primary CD4 T cells infected with pREJO. Binding of mAbs targeting different regions of gp120 was analyzed by incubating 5 μ g/ml of each mAb for 4 hrs with infected primary cells. At the same time, ADCC was measured in parallel. Mean of one representative experiment in duplicates with SEM is shown (A). The correlation of binding versus ADCC activity for the same set of mAbs (697D, 830A, 1361, 3BNC117, 10-1074, 10E8, PG9) was calculated by combining the results of 3 independent experiments, using the Pearson two-tailed correlation test. $p = 0.0171$ (B).

who used different mAbs constructed with identical heavy chains. With their panel of mAbs, they found that non-neutralizing Abs targeting V3 and the CD4 binding site of gp120 and the PID of gp41 displayed little to no detectable ADCC activity on reactivated cells isolated from HAART-treated HIV-infected patients³¹. Of note, ADCC activity with mAbs of these specificities but with distinct Fc domains has previously been described^{43,44}. Whether this discrepancy is due to the Fc domain of the Abs needs to be further assessed.

Since the Fc domains of the patient-recovered V2i mAbs were able to induce NK cell-mediated killing, they are able to efficiently trigger the Fc γ RIIIA (CD16), which is expressed on primary NK cells. We therefore propose that the combination of the heavy and light chains that constitute these V2i mAbs are particularly favorable for inducing ADCC, and that increased attention be given to the characterization of the Fc domains of Abs, since they are essential for the induction of ADCC⁴⁵.

Overall, our results revealed ADCC activity of non-neutralizing anti-V2 Abs isolated from HIV-1 infected patients. Notably, these V2i mAbs show specificities that are similar to the Abs that correlated with reduced infection rates in the RV144 vaccine trial, and the V2i mAbs displaying ADCC activity are further similar to the Abs induced in RV144, where reduced infection was correlated with ADCC rather than neutralizing activity. Further significance to the studies described above comes from the physiologically relevant ADCC assay, which employed autologous primary effector cells and primary target cells infected with primary isolates and transmitter/founder viruses. These results emphasize the potential role of anti-V1/V2 Abs for ADCC activity and further suggest that lysis of infected cells may be an additional relevant antibody inhibitory effect that we should continue to unravel to define the components required for a protective vaccine.

Materials and Methods

Cells and viruses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood via Ficoll-Hypaque sedimentation. The blood was received from healthy volunteers at the Blood Transfusion Center (EFS) in Strasbourg. Using an AutoMACS (Miltenyi Biotec) for immunomagnetic bead isolation, NK cells were separated from the PBMCs via anti-CD56 beads and then frozen in liquid nitrogen. The rest of the cells were depleted of CD8⁺ cells (anti-CD8 magnetic beads) to obtain enriched primary CD4⁺ T cells, which were then activated for 3 days using phytohemagglutinin (PHA). The activated cells were infected with purified and concentrated primary HIV-1 isolates (SF162, BaL, or TV1) for 72–96 hrs. Infection efficiency was analyzed after 2 days via flow cytometry and the cells were used if the levels of intracellular p24 were above 15%.

ADCC. The ADCC assay was performed using primary cells and primary HIV-1 isolates, as previously described³⁴. Briefly, NK cell-depleted PBMCs were infected for 4 days with primary isolates. Our ADCC assay

is highly challenging as experiments were carried out only if at least 15% of primary CD4 T cells were infected (p24+) after 4 days. 2×10^5 HIV-1 infected enriched primary CD4+ T cells were plated in 50 μ l of RPMI-1640, 10% PCS, and 50IU interleukin-2 (R&D Systems) in a U-bottom 96-well-plate and mixed with 2×10^5 autologous NK cells in 50 μ l of the same medium (1:1 effector: target ratio). 5 μ l CD107a-PE (Miltenyi Biotec) was added per 1×10^5 autologous NK cells. 25 μ l of mAbs at the indicated concentrations were added. After 4 hrs of incubation, cells were stained using Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Life Technologies), CD3-APC Vio770 (Miltenyi Biotec), CD16-PerCP Vio700 (Miltenyi Biotec), and CD56-APC (Miltenyi Biotec). Cells were then fixed and permeabilized (Cytofix/Cytoperm; BD Biosciences) and stained for intracellular p24 (KC57-RD1-FITC; Beckman Coulter) to measure infection rate. The percentage of target cell lysis was normalized to control wells without mAbs using the following formula:

$((\%p24 \text{ infected target cells with effectors} - \%p24 \text{ infected target cells with effectors and mAb}) / \%p24 \text{ infected targets with effector cells}) \times 100$. This takes into account the decreased infection rate due to direct lysis in the absence of Abs.

Less than 1% of variation within the 4 control wells was observed, demonstrating that the infection rate is highly homogeneous. Due to the complexity of this assay, a variability of the lysis capacity was observed depending on the different donor cells used. We repeated each experiment with 2 to 6 different donor cells according to the assay performed. Although the lysis intensity varied, the general pattern of ADCC activity for the different Abs was constant, demonstrating reproducibility.

mAbs. The mAbs used are listed in Table 1.

Statistics. For all experiments, the mean of at least one experiment in duplicates with SEM is shown (Figs 1 and 4: one experiment in duplicates, Fig. 2: 5–6 experiments in duplicates, Fig. 3: 2–3 experiments in duplicates). For statistical analyses in Fig. 2, a two-tailed unpaired test was carried out. The correlation of Fig. 3 was calculated by combining the results of 3 independent experiments and using the Pearson two-tailed correlation test.

Ethics Statement. Human peripheral blood mononuclear cells were purified from blood packs purchased from the blood bank (Etablissement Français du Sang, Strasbourg), with written informed consent from the donors.

References

- Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. HIV-1: nature's master of disguise. *Nat Med* **9**, 393–394, <https://doi.org/10.1038/nm0403-393> (2003).
- Strek, M. D. et al. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: Individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol* **83**, 7337–7348, <https://doi.org/10.1128/JVI.00110-09> (2009).
- Haynes, B. F. et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* **366**, 1275–1286, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113425> (2012).
- Zolla-Pazner, S. et al. Vaccine-induced IgG antibodies to V1V2 regions of multiple HIV-1 subtypes correlate with decreased risk of HIV-1 infection. *PLoS One* **9**, e87572, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087572> (2014).
- Montefiori, D. C. et al. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis* **206**, 431–441, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis367> (2012).
- Israel, Z. R., Gorny, M. K., Palmer, C., McKeating, J. A. & Zolla-Pazner, S. Prevalence of a V2 epitope in clade B primary isolates and its recognition by sera from HIV-1-infected individuals. *AIDS* **11**, 128–130 (1997).
- Lyumkis, D. et al. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**, 1484–1490, <https://doi.org/10.1126/science.1245627> (2013).
- Jullien, J. P. et al. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**, 1477–1483, <https://doi.org/10.1126/science.1245625> (2013).
- Pan, R., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. & Kong, X. P. The V1V2 Region of HIV-1 gp120 Forms a Five-Stranded Beta Barrel. *J Virol* **89**, 8003–8010, <https://doi.org/10.1128/JVI.00754-15> (2015).
- Arthos, J. et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through Integrin α 5 β 1, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* **9**, 301–309, <https://doi.org/10.1038/ni1566> (2008).
- Byrneddy, S. N. et al. Sustained virologic control in HIV-1 macaques after antiretroviral and α 5 β 1 antibody therapy. *Science* **354**, 197–202, <https://doi.org/10.1126/science.1245627> (2016).
- Upadhyay, C. et al. Distinct mechanisms regulate exposure of neutralizing epitopes in the V2 and V3 loops of HIV-1 envelope. *J Virol* **88**, 12853–12865, <https://doi.org/10.1128/JVI.02125-14> (2014).
- Mayr, L. M., Cohen, S., Spurrer, B., Kong, X. P. & Zolla-Pazner, S. Epitope mapping of conformational V2-specific anti-HIV human monoclonal antibodies reveals an immunodominant site in V2. *PLoS One* **8**, e70859, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070859> (2013).
- Gorny, M. K. et al. Functional and immunochemical cross-reactivity of V2-specific monoclonal antibodies from HIV-1-infected individuals. *Virology* **427**, 198–207, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.003> (2012).
- Gorny, M. K. et al. Human anti-V2 monoclonal antibody that neutralizes primary but not laboratory isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 8312–8320 (1994).
- Zolla-Pazner, S. et al. Analysis of V2 antibody responses induced in vaccinees in the ALVAC/AIDSVAX HIV-1 vaccine efficacy trial. *PLoS One* **8**, e53629, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053629> (2013).
- Bar, K. I. et al. Early low-titer neutralizing antibodies impede HIV-1 replication and select for virus escape. *PLoS Pathog* **8**, e1002721, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002721> (2012).
- Viellette, M. et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* **88**, 2633–2644, <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-13> (2014).
- Lee, W. S. et al. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Reactivated HIV-1-Infected Cells. *J Virol* **90**, 2021–2030, <https://doi.org/10.1128/JVI.02717-15> (2015).
- Wren, L. H. et al. Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* **138**, 116–123, <https://doi.org/10.1111/imm.12016> (2013).
- Baum, L. L. et al. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* **157**, 2168–2173 (1996).

22. Chung, A. W. et al. Activation of NK cells by ADCC antibodies and HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58, 127–131, <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31822c6289> (2011).
23. Santra, S. et al. Human Non-neutralizing HIV-1 Envelope Monoclonal Antibodies Limit the Number of Founder Viruses during SHIV Mucosal Infection in Rhesus Macaques. *PLoS Pathog* 11, e1005042, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005042> (2015).
24. Moog, C. et al. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunol* 7, 46–56, <https://doi.org/10.1038/mt.2013.23> (2014).
25. Lambotte, O. et al. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 23, 897–906, <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e328329697d> (2009).
26. Milligan, C., Richardson, B. A., John-Stewart, G., Nduati, R. & Overbaugh, J. Passively acquired antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-infected infants is associated with reduced mortality. *Cell Host Microbe* 17, 500–506, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.002> (2015).
27. Mabuka, J., Nduati, R., Odem-Davis, K., Peterson, D. & Overbaugh, J. HIV-specific antibodies capable of ADCC are common in breastmilk and are associated with reduced risk of transmission in women with high viral loads. *PLoS Pathog* 8, e1002739, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002739> (2012).
28. Chung, A. W. et al. Polyfunctional Fc-effector profiles mediated by IgG subclass selection distinguish RV144 and VAX003 vaccines. *Sci Transl Med* 6, 228ra238, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007736> (2014).
29. Su, B. & Moog, C. Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front Immunol* 5, 289, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00289> (2014).
30. Lewis, G. K., Pinzi, A., DeVico, A. L. & Paxgier, M. Conformational Masking and Receptor-Dependent Unmasking of Highly Conserved Env Epitopes Recognized by Non-Neutralizing Antibodies That Mediate Potent ADCC against HIV-1. *Viruses* 7, 5115–5132, <https://doi.org/10.3390/v7092856> (2015).
31. Bruel, T. et al. Lack of ADCC Breadth of Human Nonneutralizing Anti-HIV-1 Antibodies. *J Virol* 91, doi:e02440-16 (2017).
32. Liao, H. X. et al. Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. *Immunity* 38, 176–186, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.011> (2013).
33. Walker, L. M. et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326, 285–289, <https://doi.org/10.1126/science.1178746> (2009).
34. Gorny, M. K. et al. Identification of a new quaternary neutralizing epitope on human immunodeficiency virus type 1 virus particles. *J Virol* 79, 5232–5237, doi:79/8/5232 (2005).
35. Ackerman, M. E. et al. Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog* 12, e1005315, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005315> (2016).
36. Lewis, G. K. et al. Epitope target structures of Fc-mediated effector function during HIV-1 acquisition. *Curr Opin HIV AIDS* 9, 263–270, <https://doi.org/10.1097/COH.000000000000055> (2014).
37. Pollara, J. et al. HIV-1 vaccine-induced C1 and V2 Env-specific antibodies synergize for increased antiviral activities. *J Virol* 88, 7715–7726, <https://doi.org/10.1128/JVI.00156-14> (2014).
38. Bonsignori, M. et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J Virol* 86, 11521–11532, <https://doi.org/10.1128/JVI.01023-12> (2012).
39. Loos, A. et al. Glycan modulation and sulfonengineering of anti-HIV-1 monoclonal antibody PG9 in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 12675–12680, <https://doi.org/10.1073/pnas.1509090112> (2015).
40. von Bredow, B. et al. Comparison of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Virus Neutralization by HIV-1 Env-Specific Monoclonal Antibodies. *J Virol* 90, 6127–6139, <https://doi.org/10.1128/JVI.00347-16> (2016).
41. Huang, Y. et al. Diversity of Antiviral IgG Effector Activities Observed in HIV-Infected and Vaccinated Subjects. *J Immunol* 197, 4603–4612, doi:10.1093/immuni.1601197 (2016).
42. Tiller, T. et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329, 112–124, doi:S0022-1759(07)00312-2 (2008).
43. Chung, A. W. et al. Identification of antibody glycosylation structures that predict monoclonal antibody Fc-effector function. *AIDS* 28, 2523–2530, <https://doi.org/10.1097/QAI.0b000000000000444> (2014).
44. Pollara, J. et al. Epitope specificity of human immunodeficiency virus-1 antibody dependent cellular cytotoxicity [ADCC] responses. *Curr HIV Res* 11, 378–387, doi:CHIVR-EPUB-57200 (2013).
45. Gamm, B. M. & Allier, G. Modulating Antibody Functionality in Infectious Disease and Vaccination. *Trends Mol Med* 22, 969–982, doi:S1471-4914(16)30117-4 (2016).
46. Zhang, W., Goddard, A. P., Wyatt, R., Sodroski, J. & Chaiken, I. Antibody 17b binding at the coreceptor site weakens the kinetics of the interaction of envelope glycoprotein gp120 with CD4. *Biochemistry* 40, 1662–1670, doi:10.1093/biochem/40.10.1662 (2001).
47. Shingai, M. et al. Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* 503, 277–280, <https://doi.org/10.1038/nature12746> (2013).
48. Huang, J. et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491, 406–412, <https://doi.org/10.1038/nature11544> (2012).
49. Pinter, A. et al. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* 78, 5205–5215 (2004).
50. Nyambi, P. N. et al. Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol* 74, 7096–7107 (2000).
51. Gorny, M. K., VanCott, T. C., Williams, C., Revesz, K. & Zolla-Pazner, S. Effects of oligomerization on the epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Virology* 267, 220–228, <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0095> (2000).
52. Pincus, S. H. et al. In vivo efficacy of anti-glycoprotein 41, but not anti-glycoprotein 120, immunotoxins in a mouse model of HIV infection. *J Immunol* 170, 2236–2241 (2003).
53. Scheid, J. F. et al. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333, 1633–1637, <https://doi.org/10.1126/science.1207227> (2011).
54. Mouquet, H. et al. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E3268–E3277, <https://doi.org/10.1073/pnas.1217207109> (2012).
55. Lee, J. H. et al. Antibodies to a conformational epitope on gp41 neutralize HIV-1 by destabilizing the Env spike. *Nat Commun* 6, 8167, <https://doi.org/10.1038/ncomms9167> (2015).

Acknowledgements

CH58 and CH59 were kindly provided by X. Kong, and mAbs 3BC176 and 10–1074 by H. Mouquet. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: mAbs PG9, 7B2, 10E8, and 3BNC117^{14,15,33,38,46–50}. This work was supported by the Investissements d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77, Sidaction Pierre Bergé under grand number AP-PPB-2013-2/06 and in part by NIH grant number P01 AI100151 (SZP). Dr. Zolla-Pazner was also supported in part by funds from the Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai. L. Mayr was supported by an ANRS fellowship.

Author Contributions

L.M., S.B., S.Z.P. and C.M. wrote the manuscript. L.M., S.Z.P. and C.M. designed the experiments. L.M. and T.D. performed the experiments. L.M., T.D., S.Z.P. and C.M. analyzed the data. S.S., G.L., J.K. and C.D. provided cells and virus stocks. L.M. and C.M. directed the project.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Publication 5

La transmission du VIH des lymphocytes T CD4⁺ aux lymphocytes T hétérologues et aux cellules dendritiques est inhibée par des anticorps neutralisants à large spectre

HIV transmission from infected CD4⁺ T cells to allogenic T and dendritic cells is inhibited by broadly neutralizing antibodies

Camille Ducloy, Bin Su, Luzia Mayr, Jéromine Klingler, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Géraldine Laumond, Nathalie Salomé, Seiamak Bahram, Christiane Moog

269

AIDS, 2018

Lors des rapports sexuels, le virus libre et les cellules infectées présents dans le sperme sont capables d'établir l'infection par le VIH. Un vaccin préventif efficace devrait donc inhiber les deux modes d'infection. Le but de cette étude était d'analyser la capacité d'anticorps neutralisants à large spectre à inhiber la transmission du VIH par des cellules infectées.

Dans ce but, notre laboratoire a mis en place et développé un modèle *in vitro* visant à imiter la transmission du VIH via des cellules infectées au niveau des muqueuses. Des lymphocytes T CD4⁺ d'un donneur A ont été activés par de la phytohémagglutinine et marqués par un fluorochrome (PKH26) puis ont été infectés et co-cultivés avec des lymphocytes T CD4⁺ et des cellules dendritiques d'un receveur B en présence ou non d'anticorps neutralisants à large spectre.

Nous avons observé que les cellules infectées du donneur A transmettent rapidement le virus aux cellules dendritiques et aux lymphocytes T CD4⁺ du receveur B après 24 heures de co-culture. De manière intéressante, nous observons que, dans ce modèle, les cellules dendritiques sont préférentiellement infectées à 24 et 72 heures post-infection. Après un traitement des cellules avec de l'azidothymidine (AZT, inhibiteur de la transcriptase inverse), nous observons que l'infection des cellules dendritiques est productive. En présence d'indinavir (IDV, inhibiteur de la protéase), la transmission du virus du donneur A aux cellules du receveur B est principalement en cis après 72 heures de co-culture. Nos résultats contredisent les résultats précédemment publiés décrivant la restriction du VIH-1 dans les cellules dendritiques.

Nous avons ensuite analysé la capacité inhibitrice de différents anticorps neutralisants dans cette co-culture : 3BNC117, dirigé contre le site d'attachement au CD4, 10-1074 et PGT121,

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH

dirigés contre la boucle variable V3 de la gp120 et 4E10, dirigé contre la région MPER de la gp41. Les anticorps neutralisants inhibent la transmission du virus des cellules infectées du donneur A aux cellules du receveur B. De manière intéressante, nous observons également une diminution de la réplication virale dans les cellules du donneur A. Ces résultats montrent que, dans notre modèle de co-culture, les anticorps sont capables d'inhiber la transmission du virus des lymphocytes T CD4⁺ du donneur A aux cellules du receveur B mais également d'inhiber l'infection des lymphocytes T CD4⁺ du donneur A.

270

Cette étude correspond essentiellement au travail de thèse mené par la doctorante C. Ducloy dans notre laboratoire. Dans cette étude, j'ai réalisé certaines expériences et participé à la révision du manuscrit.

CONCISE COMMUNICATION

HIV transmission from infected CD4⁺ T cells to allogenic T and dendritic cells is inhibited by broadly neutralizing antibodies

Camille Ducloy^a, Bin Su^b, Luzia Mayr^a, Jérôme Klingler^a,
Thomas Decoville^a, Sylvie Schmidt^a, Géraldine Laumond^a,
Nathalie Salomé^a, Seiamak Bahram^a and Christiane Moog^{a,c}

271

Objective: In the semen, both free virus and infected cells are able to establish HIV infection during sexual intercourse. An efficient vaccine should therefore inhibit both infectious states. The aim of this study was to analyze the capacity of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) to inhibit HIV transmission by the infected cells.

Design/methods: We developed an in-vitro model aiming to mimic mucosal HIV transmission via infected cells. PHA-activated CD4⁺ T cells stained with PKH26 from donor A were infected and co-cultured with CD4⁺ T cells and dendritic cells from donor B in the presence of bNAbs.

Results: We showed that dendritic cells were the preferential HIV target cells at early time points in this co-culture model. In the context of this co-culture model where infection and transmission occurred simultaneously, bNAbs efficiently inhibited HIV replication as well as HIV transmission from infected cells to allogenic dendritic cells and CD4⁺ T cells.

Conclusion: Overall, our results indicate that dendritic cells, in addition to CD4⁺ T cells, are key cells that are efficiently infected by HIV and bNAbs are potent inhibitors of infection of both target cells. Future HIV prophylactic vaccine design should develop immune strategies able to prevent the infection of dendritic cells, in addition to the inhibition of CD4⁺ T-cell infection.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2018, **32**:1239–1245

Keywords: allogenic T cells, broadly neutralizing antibodies, dendritic cells, HIV cell-to-cell transmission

^aINSERM U1109, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ^bBeijing Key Laboratory for HIV/AIDS Research, Center for Infectious Diseases, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, and ^cVaccine Research Institute (VRI), Créteil, France.

Correspondence to Christiane Moog, PhD, INSERM U1109, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, Strasbourg 67000, France. Tel: +33 368 853 742; fax: +33 368 854 016; e-mail: c.moog@unistra.fr

Received: 22 December 2017; revised: 27 February 2018; accepted: 17 March 2018.

DOI:10.1097/QAD.0000000000001834

ISSN 0269-9370 Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.
Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

1239

Introduction

During sexual intercourse, free viruses and infected cells, both contained in the semen, disseminate into the female genital tract (reviewed in [1–7]). Recently, simian immunodeficiency virus/chimeric simian human immunodeficiency virus (SIV/SHIV) infection was established following an intravaginal challenge of infected cell in the female macaque genital track [8] firmly demonstrating that HIV sexual transmission can occur directly with infected cells [1,8–11]. In the mucosa, the identity of the first HIV cellular target is still a matter of debate. On the one hand, dendritic cells have been proposed to be the first target cells capturing the antigen and transferring HIV to neighboring CD4⁺ T cells [12–14]. Moreover, recent studies reported an enhancement of HIV replication in immature dendritic cells when these cells were co-cultured with CD4⁺ T cells [15–18], indicating that dendritic cells are HIV replication-competent when they are in contact with CD4⁺ T cells. On the other hand, infection of whole tissue explants showed that mostly CD4⁺ T cells were infected [19–21]. These results indicate that either dendritic cells and/or CD4⁺ T cells may represent the first HIV target following sexual intercourse.

Strategic preventive approaches to inhibit HIV in the macaque model of in-vivo mucosal challenge have mainly focused on the inhibition of free viral particles and in-vivo models of inhibition of transmission by infected cells were not well elucidated. *In vitro*, however, the inhibitory potential of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) on the cell-to-cell HIV-1 transmission has been largely examined ([17,22–32] reviewed in [33–36]). These studies analyzed the HIV transfer from infected cell lines to target cell lines [22,24,26–29,31] or target primary CD4⁺ T cells [27–29,31], or the transmission from primary dendritic cells to CD4⁺ T cells [15,17,23,25,30,32]. It is noteworthy that the inhibitory potential of bNAbs on HIV transmission varied according to the type of cell and of virus used in the assay. Moreover, none of these assays analyzed the inhibitory potential of bNAbs when HIV was transmitted from cells by another donor under allogenic conditions, the real-life situation, which occurs following HIV mucosal transmission by infected cells present in semen or cervicovaginal secretions. Indeed, dendritic cells are professional antigen-presenting cells that will be activated by allogenic cells from nonself origin. dendritic cells may therefore be favorably triggered in the presence of infected cells from an allogenic donor [13,37–39].

The aim of this study was to decipher the inhibitory potential of bNAbs on mucosal transmission by allogenic HIV-infected cells. Therefore, we developed an in-vitro model where T cells from donor A transmit HIV to dendritic cells and T cells of donor B and we analyzed the inhibitory potential of bNAbs under these conditions.

Materials and methods

Cell preparations

The primary immature monocyte were isolated using CD14⁺ Microbeads selection kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and differentiated into dendritic cells as previously described [16–18,40]. Autologous CD4⁺ T lymphocytes were purified by positive selection after CD14⁺ purification and activated by incubation with phytohemagglutinin A (PHA) (2 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l, France) for 3 days. Cells were stored frozen and thawed 1 day before use.

All human blood samples were collected from healthy anonymized donors seronegative for HIV-1 and hepatitis C virus (EFS, Strasbourg, France).

Cell infection

The 30 × 10⁶ PHA activated CD4⁺ T cells were infected with 1 µg of concentrated HIV-1 stocks (Bal, Bx08). After 24 h, cells were stained with PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and extensively washed to remove all free virus particles. This dye allows to discriminate these infected T cells from allogenic donor/target cells.

Heterologous transfer model

Monocyte-derived dendritic cells and their corresponding PHA-activated autologous CD4⁺ T cells were co-cultured with the PKH26-stained infected CD4⁺ T cells from another donor with a final ratio of one dendritic cell for two autologous CD4⁺ T cells and two allogenic infected CD4⁺ T cells. Whenever indicated, 5 µM AZT (Sigma-Aldrich), a reverse transcriptase inhibitor or 1 µM IDV, a protease inhibitor were added in the co-culture. To analyze the inhibitory capacity of bNAbs, 10-1074, 3BNC117, PGT121 obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH and 4E10 obtained from Polynum Scientific (Klosterneuburg, Austria) were added at different concentrations in the co-culture. Infected cells were detected by intracellular p24 staining in the different cellular populations after 24 and 72 h of co-culture. Briefly, cells were stained using Live/Dead Fixable Violet Dead Cells Stain Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and labeled with CD3 APC-Vio770 (Miltenyi Biotec), CD209 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Cells were then fixed and permeabilized with the Cytotfix/Cytoperm wash kit solution (BD Biosciences, Brea, California, USA) before being labeled with HIV core p24 antibody (Beckman Coulter, Brea, California, USA). The percentage of each infected cell population positive for p24 was defined by flow cytometry (MacQuant, Miltenyi Biotec) and analyzed using the Kaluza software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's unpaired *t*-test and $P < 0.05$ was considered significant. Prism, version 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) was used for all statistical analyses.

Results

Dendritic cells are the first HIV target cells in the allogenic dendritic cell/T-cell transmission model

In this allogenic model, T cells from donor A were infected for 24 h. At that time point, the percentage of infected cells is very low (around 1%) and almost no free virus particles are detected in the supernatant [17]. Infected cells were further labeled with PKH26, extensively washed and co-cultivated with T cells and dendritic cells from donor B for 24 and 72 h (Fig. 1a). Under these conditions, HIV transmission in the absence of free virus particles can be measured [17]. We observed the infection of $CD4^+$ T cells from donor A and a rapid transmission to donor B cells with HIV-1_{BaL} or a transmitted/founder (T/F) primary isolate HIV-1_{Bx08} as early as 24 h (Fig. 1b). At that time, the detection of HIV replication in the different cell types corresponds to a single round of HIV replication, that is, HIV transmission from cells of donor A to cells of donor B [17]. In order to allow normalization of the cell infection rate of donor B according to the infection rate of $CD4^+$ T cells from donor A, the ratio of the percentage of infected cells from donor B to the percentage of infected $CD4^+$ T cells from donor A was calculated (Fig. 1c). Remarkably, after 24 h, the ratio of HIV-1_{BaL} and HIV-1_{Bx08}-infected dendritic cell from donor B was significantly higher ($P < 0.05$) than that of infected $CD4^+$ T cells from donor B, demonstrating that HIV transmission by infected $CD4^+$ T cells from donor A preferentially occurs in dendritic cells. After 72 h, the infection rate for dendritic cells was still higher compared to $CD4^+$ T cells, although the difference was no more statistically significant for HIV-1_{Bx08} (Fig. 1c). These results indicate that dendritic cells are highly susceptible HIV-1 target cells under these co-culture transfer conditions.

Detection of multiple cycles of HIV replication in cells from donor B after 3 days

In order to measure HIV replication, the reverse transcriptase inhibitor azidothymidine (AZT) was added to the co-culture at the same time as the infected T cells. After 72 h, HIV replication in T cells from donor A treated with AZT decreased by about 90% (Fig. 1d), demonstrating that HIV continues to spread in these cells under these co-culture conditions. Moreover, the percentage of $p24^+$ cells decreased by 86% (dendritic cells) and 82% (T cells) from donor B for HIV-1_{BaL} or 78% (dendritic cells) and 89% (T cells) for HIV-1_{Bx08}. This indicates that the $p24$ detected after 72 h in these

cells represents new viral production. These results show that all three cell populations are productively infected after 72 h.

In order to discriminate HIV transmission from cells of donor A to donor B from subsequent virus replication, the protease inhibitor indinavir (IDV) was added at the same time as the infected cells from donor A (Fig. 1e). IDV blocks the final assembly and maturation of newly synthesized virions, therefore restricting HIV transmission from donor A $CD4^+$ T cells to cells from donor B to a single round. In the presence of IDV, we observed a significant decrease of infected cells from donor B at 72 h. Twenty-five percent and 21% of dendritic cells and 20% and 7% of T cells from donor B for HIV-1_{BaL} and HIV-1_{Bx08}, respectively, were infected in the presence of IDV (shaded histogram). These percentages correspond to virus transmitted from HIV-infected $CD4^+$ T cells from donor A. The remaining infection, 75% and 79% infected dendritic cells and 80% and 93% infected $CD4^+$ T cells for HIV-1_{BaL} and HIV-1_{Bx08}, respectively, corresponds to the replication of newly produced virus from the three cell types (filled histogram). This result indicates that after 72 h, a large percentage of cells from donor B were infected by newly synthesized virions. This new virus production is because of subsequent cell-to-cell transmission from either donor A or donor B infected cells. However, we cannot exclude that few infections already occur with the free virus particles released in the supernatant, even though the proportion of free virus particles released at these early time points is of very limited amount [17,18].

Broadly neutralizing antibodies efficiently inhibit HIV transmission in the co-culture model

To analyze the inhibition of HIV transmission to donor B, bNAbs against the HIV gp120 protein (10–1074, 3BNC117, PGT121) and against gp41 (4E10) were added at the same time as infected cells from donor A. We initially measured a dose–response inhibitory activity at 0.05, 0.5 and 5 $\mu\text{g/ml}$ for 10–1074, 3BNC117, PGT121 and at 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ for 4E10 (Fig. 2a and c). We observed an inhibition of HIV replication in the three HIV target cells, with slight variation of Ab inhibitory profile according to the target cell analyzed. The IC80 (inhibition of HIV replication by 80%) on $CD4^+$ T-target cells from donor A cells referred to as neutralization) was 0.5, 0.05, 0.05 and 100 $\mu\text{g/ml}$ for Abs 10–1074, 3BNC117, PGT121 and 4E10, respectively. These concentrations correspond to the IC80 neutralizing activity classically observed with these Abs on primary PBMCs [41]. In order to define if the IC80 on dendritic cell and $CD4^+$ T cells from donor B varied significantly from that of donor A, the mean Ab inhibitory activity for the three HIV target cells was determined on five independent experiments performed with five different donor cells (Fig. 2b and d). For HIV-1_{BaL}, the inhibitory activity of these Abs was similar for the three cell types

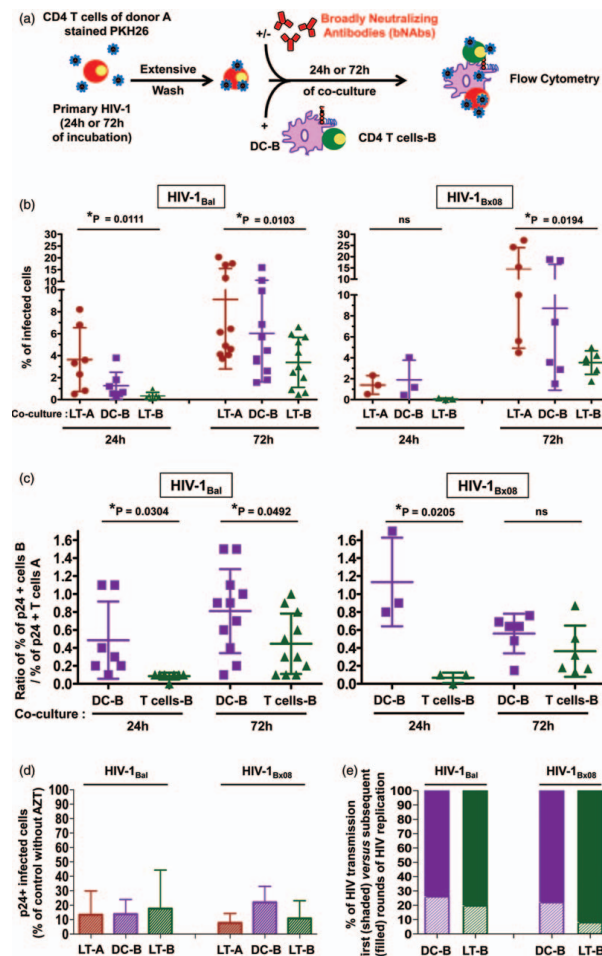


Fig. 1. HIV transmission from infected CD4⁺ T cells of donor A to dendritic cells and CD4⁺ T cells of donor B (an allogenic model). (a) Experimental design: T cells of donor A (LT-A) infected with primary HIV-1_{Bal} or HIV-1_{Bx08} for 24 h and labeled with PKH26 membrane dye were co-cultured for 24 or 72 h with CD4⁺ T cells and dendritic cells from donor B. The percentage of cells infected in each cell population was determined by intracellular viral p24 antigen staining. (b) Percentage of cells infected with HIV-1_{Bal} or HIV-1_{Bx08} in each cell population: PKH26 positive T cells of donor A (LT-A, red), CD209-positive dendritic cells from donor (DC-B, purple) and CD3-positive PKH26 negative CD4⁺ T cells from donor B (LT-B, green) after 24 and 72 h of co-culture. Mean $\pm$ SD of seven independent experiments performed with different donor cells are shown. (c) Ratio of the percentage of HIV-1-infected dendritic cells (purple) or T cells of donor B (green) compared with the percentage of infected PKH26-labeled T cells of donor A was calculated. Mean $\pm$ SD of seven independent experiments performed with different donor cells are shown. (d) The HIV-1 reverse transcriptase inhibitor azidothymidine (AZT) (5 μ M) or (e) the HIV-1 protease inhibitor IDV (1 μ M) were added to the co-culture. Infection was assessed after 72 h of co-culture and the percentage of HIV-1-infected cells in each population, PKH26-stained T cells of donor A (LT-A red), CD209⁺ dendritic cells (DC-B, purple) and CD3⁺ T cells of donor B (LT-B, green) was compared with the control-infected cells without AZT (d) or IDV (e). (e) Percentage of HIV transmission (transfer of HIV from CD4⁺ T cells from donor A, shaded histogram, % p24⁺ cells detected in the presence of IDV) and subsequent round of HIV transfer from the three infected cell types (filled histogram, 100 – percentage of p24⁺ cells detected in the presence of IDV). Mean $\pm$ SD of four and five independent experiments performed with different donor cells for AZT and IDV, respectively. Statistical analysis was performed using Student unpaired-test and $P < 0.05$ was considered significant.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

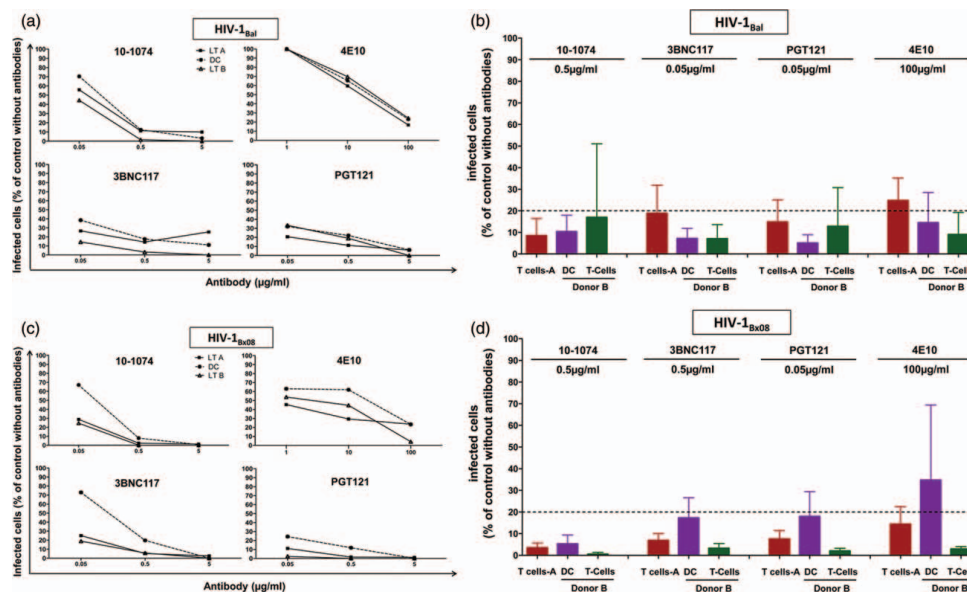


Fig. 2. Inhibition by broadly neutralizing antibodies of HIV transmission of HIV-1_{Bal}-infected T cells from donor A to dendritic cells and CD4⁺ T cells from donor B. bNABs against HIV CD4bs (3BNC117) or V3-glycan (10-1074, PGT121) or gp41 protein (4E10) were co-cultured with T cells of donor A infected with HIV-1_{Bal} or HIV-1_{Bx08} and dendritic cells and T cells of donor B for 72 h. The percentage of infected cells in the presence of bNABs compared with the percentage of infected cells in the absence of bNABs was calculated. (a and c) Dose-response curve of mAbs added at different concentrations 0.05, 0.5, and 5 μ g/ml for bNABs 10-1074, 3BNC117, and PGT121, and at 1, 10, and 100 μ g/ml for bNAB 4E10. One representative experiment out of three is shown. (b and d) Percentage of infected cells for each population in the presence of bNABs at the concentration indicated mean $\pm$ SD of five independent experiments performed with different donors is shown. Statistic analysis was performed using Student unpaired-test ($P > 0.05$).

studied. For HIV-1_{Bx08}, the inhibition by these bNABs is more efficient in CD4⁺ T cells from donor B than in dendritic cells; however, these differences were not statistically significant ($P > 0.05$). These results show that the inhibitory activity is cell-type and virus-type specific as previously emphasized [35,36,42]. Overall, bNABs show potent inhibitory activity in the three cellular populations. Therefore, under co-culture conditions, bNABs inhibit not only new virus replication in CD4⁺ T cells from donor A, but also the transfer from infected cells of donor A to dendritic cells and CD4⁺ T cells from donor B.

Discussion

Although the mechanisms of HIV transmission have been extensively analyzed and reviewed [35,36,43–46], the present study documents for the first time that HIV transmission can occur in an allogenic context using infected T cells from donor A in co-culture with uninfected dendritic cells and T cells from donor B. With this allogenic model, we found that infected T cells were

able to rapidly, within 24 h, transmit HIV to allogenic dendritic cells and T cells. Importantly, under these conditions, dendritic cells were preferentially infected at an early time point. This efficient replication in dendritic cells may be explained by the antigen presenting functions of these cells. In fact, dendritic cells are programmed to recognize nonself-antigens on allogenic cells. Therefore, dendritic cells can rapidly interact with CD4⁺ T cells from donor A recognized as nonself. This close dendritic cell/T-cell contact may favor HIV transmission to dendritic cells. Previously, we found that the presence of autologous T cells enhances HIV replication in the dendritic cells [15–18]. We also showed that this increase of HIV replication in the dendritic cells was because of close dendritic cell/T-cell contact [16,18] and was associated with a down regulation of a restriction factor SAMHD1 in these cells [15,16]. Our current findings confirm the high infection rate of dendritic cells and further demonstrate that dendritic cells are the preferential target in an allogenic model, where infected CD4⁺ T cells have the choice to either transmit HIV to dendritic cells or to CD4⁺ T cells. Moreover, treatment with AZT

confirmed that this infection corresponds to newly synthesized virus and treatment with IDV showed that, although new replication occurs after 72 h, about 20% of infected dendritic cells was because of early HIV transmission from donor A CD4⁺ T cells.

The present results contradict previous observations of HIV restriction in dendritic cells [47,48]. However, the main methodological difference between these studies and our current results is the dendritic cell/T-co-culture model. Moreover, the studies showing HIV restriction in dendritic cells all analyze the infection of these cells as purified dendritic cell population, whereas the high infection rate of dendritic cells observed here is in the presence of CD4⁺ T cells at a one dendritic cells to four CD4⁺ T-cell ratio. Our study firmly demonstrates that dendritic cells are efficient HIV targets in co-culture conditions. Whether such dendritic cell/T cell cross-talk is relevant in infected tissues and whether infected CD4⁺ T cells in the semen can disseminate in cervicovaginal tissues following infection of tissue resident dendritic cells needs to be further analyzed.

The inhibitory potential of bNAbs on HIV transmission is controversial, with some publications suggesting a decreased inhibitory activity on HIV cell-to-cell transmission compared with free viruses [22,24,27] and others proposing a similar inhibitory activity between HIV transmission and infection [15,17,23,49]. Noteworthy, such a comparison is hampered by the necessity to use similar HIV target cells and normalize cell-free versus cell-associated HIV infection in two distinct assays [36]. In the context of our co-culture model, we simultaneously analyzed antibody inhibitory activity on the transmission to dendritic cells and CD4⁺ T cells of donor B (i.e. inhibition of HIV transmission) and on the subsequent infection of CD4⁺ T cells of donor A (i.e. neutralization). Although some slight variation in inhibitory potential were observed depending on virus and on the donor/target cells used, infection was decreased to a similar extent in the three populations studied, indicating that neutralization and inhibition of HIV cell-to-cell transmission is comparable between T-to-T or dendritic cells-to-T cells. These results observed with IgG antibody isotype now need to be performed with secretory IgA antibodies as they are largely present at the mucosa site. Overall, our findings indicate that an efficient Ab response induced at the mucosal site could prevent HIV transmission to dendritic cells as well as the infection of surrounding CD4⁺ T cells.

In summary, our data suggest that dendritic cells play a central role in early HIV transmission in the mucosa and that bNAbs efficiently prevent this transmission. These results on inhibitory potential of Abs on cell-free versus cell-to-cell transmission of HIV are of direct relevance for the design and development of prophylactic HIV-1 vaccine, passive immunotherapy, and antiviral therapy.

Acknowledgements

We thank the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), the Vaccine Research institute, Investissements d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77, INSERM UMR_S 1109, Fonds de Dotation Pierre Berge, the National Natural Science Foundation of China (81772165), the Funding for Chinese overseas talents returning to China in 2016 (B.S.), and the Beijing Key Laboratory for HIV/AIDS Research (BZ0089) for financial support. C.D. was supported by a doctoral fellowship from SIDACTION. L.M. was supported by a postdoctoral fellowship from ANRS. J.K. was supported by a doctoral fellowship from University of Strasbourg. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or the preparation of the manuscript.

B.S. and C.M. conceived the study. C.D., B.S., and C.M. designed the experiments, and analyzed the data. C.D., B.S., J.K., and L.M. performed the experiments; T.D., S.S., G.L., and N.S. contributed reagents and materials; and C.D., B.S., L.M., S.B. and C.M. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript submitted for publication.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Kariuki SM, Selhorst P, Arien KK, Dorfman JR. **The HIV-1 transmission bottleneck.** *Retrovirology* 2017; **14**:22.
2. Heron SE, Elahi S. **HIV infection and compromised mucosal immunity: oral manifestations and systemic inflammation.** *Front Immunol* 2017; **8**:241.
3. Gagneux-Brunon A, Rochereau N, Botelho-Nevers E, Lucht F, Pozzetto B, Paul S, et al. **Humoral responses against HIV in male genital tract: role in sexual transmission and perspectives for preventive strategies.** *AIDS* 2017; **31**:1055–1064.
4. Iwasaki A. **Exploiting Mucosal Immunity for Antiviral Vaccines.** *Annu Rev Immunol* 2016; **34**:575–608.
5. Dutartre H, Claviere M, Journo C, Mahieux R. **Cell-Free versus Cell-to-Cell Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Exploring the Link among Viral Source, Viral Trafficking, and Viral Replication.** *J Virol* 2016; **90**:7607–7617.
6. Anderson DJ, Le Grand R. **Cell-associated HIV mucosal transmission: the neglected pathway.** *J Infect Dis* 2014; **210** (Suppl 3):S606–S608.
7. Hladik F, McElrath MJ. **Setting the stage: host invasion by HIV.** *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:447–457.
8. Bernard-Stoecklin S, Gomet C, Cavarelli M, Le Grand R. **Nonhuman primate models for cell-associated simian immunodeficiency virus transmission: the need to better understand the complexity of HIV mucosal transmission.** *J Infect Dis* 2014; **210** (Suppl 3):S660–S666.
9. Kolodkin-Gal D, Hulot SL, Koriath-Schmitz B, Gombos RB, Zheng Y, Owuor J, et al. **Efficiency of cell-free and cell-associated virus in mucosal transmission of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus.** *J Virol* 2013; **87**:13589–13597.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

10. Bernard-Stoecklin S, Gomet C, Corneau AB, Guenounou S, Torres C, Dejuccq-Rainsford N, *et al.* **Semen CD4+ T cells and macrophages are productively infected at all stages of SIV infection in macaques.** *PLoS Pathog* 2013; **9**:e1003810.
11. Sallé B, Brochard P, Bourry O, Mannioui A, Andrieu T, Prevot S, *et al.* **Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus.** *J Infect Dis* 2010; **202**:337–344.
12. Cavarelli M, Foglieni C, Rescigno M, Scarlatti G. **R5 HIV-1 envelope attracts dendritic cells to cross the human intestinal epithelium and sample luminal virions via engagement of the CCR5.** *EMBO Mol Med* 2013; **5**:776–794.
13. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, *et al.* **Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1.** *Immunity* 2007; **26**:257–270.
14. de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluïtsma D, de Jong MA, de Gruijl T, *et al.* **Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells.** *Nat Med* 2007; **13**:367–371.
15. Su B, Lederle A, Laumond G, Ducloy C, Schmidt S, Decoville T, *et al.* **Broadly neutralizing antibody VRC01 prevents HIV-1 transmission from plasmacytoid dendritic cells to CD4 T lymphocytes.** *J Virol* 2014; **88**:10975–10981.
16. Su B, Biedma ME, Lederle A, Peressin M, Lambotin M, Proust A, *et al.* **Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells.** *J Virol* 2014; **88**:5109–5121.
17. Su B, Xu K, Lederle A, Peressin M, Biedma ME, Laumond G, *et al.* **Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes.** *Blood* 2012; **120**:3708–3717.
18. Holl V, Xu K, Peressin M, Lederle A, Biedma ME, Delaporte M, *et al.* **Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes.** *J Virol* 2010; **84**:4172–4182.
19. Shang L, Duan L, Perkey KE, Wietgreffe S, Zupancic M, Smith AJ, *et al.* **Epithelium-innate immune cell axis in mucosal responses to SIV.** *Mucosal Immunol* 2017; **10**:508–519.
20. Merbah M, Arakelyan A, Edmonds T, Ochsenbauer C, Kappes JC, Shattock RJ, *et al.* **HIV-1 expressing the envelopes of transmitted/founder or control/reference viruses have similar infection patterns of CD4 T-cells in human cervical tissue ex vivo.** *PLoS One* 2012; **7**:e50839.
21. Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, *et al.* **Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system.** *J Virol* 2002; **76**:9868–9876.
22. Li H, Zony C, Chen P, Chen BK. **Reduced potency and incomplete neutralization of broadly neutralizing antibodies against cell-to-cell transmission of HIV-1 with transmitted founder Envs.** *J Virol* 2017; **91**:pii e02425–16.
23. Su B, Peressin M, Ducloy C, Penichon J, Mayr LM, Laumond G, *et al.* **Short communication: exploring antibody potential as prophylactic/therapeutic strategies for prevention of early mucosal HIV-1 infection.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015; **31**:1187–1191.
24. Gombos RB, Kolodkin-Gal D, Eslamizar L, Owuor JO, Mazzola E, Gonzalez AM, *et al.* **Inhibitory effect of individual or combinations of broadly neutralizing antibodies and antiviral reagents against cell-free and cell-to-cell HIV-1 transmission.** *J Virol* 2015; **89**:7813–7828.
25. Peressin M, Proust A, Schmidt S, Su B, Lambotin M, Biedma ME, *et al.* **Efficient transfer of HIV-1 in trans and in cis from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T lymphocytes.** *AIDS* 2014; **28**:667–677.
26. Zhong P, Agosto LM, Ilinskaya A, Dorjbal B, Truong R, Derse D, *et al.* **Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV.** *PLoS One* 2013; **8**:e53138.
27. Malbec M, Porrot F, Rua R, Horwitz J, Klein F, Halper-Stromberg A, *et al.* **Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission.** *J Exp Med* 2013; **210**:2813–2821.
28. Abela IA, Berlinger L, Schanz M, Reynell L, Gunthard HF, Rusert P, *et al.* **Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies.** *PLoS Pathog* 2012; **8**:e1002634.
29. Dale BM, McNeerney GP, Thompson DL, Hubner W, de Los Reyes K, Chuang FY, *et al.* **Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion.** *Cell Host Microbe* 2011; **10**:551–562.
30. van Montfort T, Nabatov AA, Geijtenbeek TB, Pollakis G, Paxton WA. **Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4+ T lymphocytes.** *J Immunol* 2007; **178**:3177–3185.
31. Chen P, Hubner W, Spinelli MA, Chen BK. **Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses.** *J Virol* 2007; **81**:12582–12595.
32. Cavrois M, Needleman J, Kreisberg JF, Greene WC. **In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions.** *PLoS Pathog* 2007; **3**:e4.
33. Smith SA, Derdeyn CA. **New connections: cell-to-cell HIV-1 transmission, resistance to broadly neutralizing antibodies, and an envelope sorting motif.** *J Virol* 2017; **91**:pii: e00149-17.
34. Pegu A, Hessel AJ, Mascola JR, Haigwood NL. **Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention.** *Immunol Rev* 2017; **275**:296–312.
35. Su B, Moog C. **Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine?** *Front Immunol* 2014; **5**:289.
36. Schiffrer T, Sattentau QJ, Duncan CJ. **Cell-to-cell spread of HIV-1 and evasion of neutralizing antibodies.** *Vaccine* 2013; **31**:5789–5797.
37. Botting RA, Rana H, Bertram KM, Rhodes JW, Baharloo H, Nasr N, *et al.* **Langerhans cells and sexual transmission of HIV and HSV.** *Rev Med Virol* 2017; **27**:e1923.
38. Cunningham AL, Harman AN, Nasr N. **Initial HIV mucosal infection and dendritic cells.** *EMBO Mol Med* 2013; **5**:658–660.
39. Wu L, KewalRamani VN. **Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination.** *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:859–868.
40. Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, Aubertin AM, *et al.* **Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells.** *J Virol* 2006; **80**:6177–6181.
41. Cohen YZ, Lorenzi JCC, Seaman MS, Nogueira L, Schoofs T, Krassnig L, *et al.* **Neutralizing activity of broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies against clade B clinical isolates produced in peripheral blood mononuclear cells.** *J Virol* 2018pii: e01883–17.
42. Fenyo EM, Heath A, Dispinseri S, Holmes H, Lusso P, Zolla-Pazner S, *et al.* **International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report.** *PLoS One* 2009; **4**:e4505.
43. Law KM, Satija N, Esposito AM, Chen BK. **Cell-to-cell spread of HIV and viral pathogenesis.** *Adv Virus Res* 2016; **95**:43–85.
44. Graw F, Perelson AS. **Modeling Viral Spread.** *Annu Rev Virol* 2016; **3**:555–572.
45. Casartelli N. **HIV-1 cell-to-cell transmission and antiviral strategies: an overview.** *Curr Drug Targets* 2016; **17**:65–75.
46. Agosto LM, Uchil PD, Mothes W. **HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy.** *Trends Microbiol* 2015; **23**:289–295.
47. Laguet N, Sobhian B, Casartelli N, Ringard M, Chable-Bessia C, Segal E, *et al.* **SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx.** *Nature* 2011; **474**:654–657.
48. Manel N, Hogstad B, Wang Y, Levy DE, Unutmaz D, Littman DR. **A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells.** *Nature* 2010; **467**:214–217.
49. Duncan CJ, Russell RA, Sattentau QJ. **High multiplicity HIV-1 cell-to-cell transmission from macrophages to CD4+ T cells limits antiretroviral efficacy.** *AIDS* 2013; **27**:2201–2206.

Caractérisation du profil d'anticorps et de leurs activités inhibitrices chez des patients contrôleurs du VIH

279

Résumé

Les patients qui contrôlent l'infection par le VIH sans traitement (HIC) représentent un groupe d'étude unique pour identifier des réponses immunitaires associées à ce contrôle. En plus du statut protecteur HLA-B*57, la réponse humorale pourrait participer à ce contrôle. J'ai comparé la réponse B, les caractéristiques isotypiques et les fonctions des anticorps (Ac) des HIC selon leur statut HLA-B*57 et par rapport à des patients chroniques progressant vers la maladie (CP). Chez les HIC, les lymphocytes B (LB) mémoires anti-VIH sont préservés. Des profils d'Ac distincts sont observés entre les HIC HLA-B*57+ (fortes activités médiées par les récepteurs Fc, association entre fréquence des LB et neutralisation), les HIC HLA-B*57- (neutralisation à large spectre) et les CP (forts taux d'immunoglobulines A anti-VIH, forte neutralisation). La caractérisation fine des profils particuliers des Ac nous guidera dans l'élaboration de nouveaux immunogènes capables d'induire une réponse humorale protectrice par vaccination.

Mots-clés : VIH-1, contrôleurs, HLA-B*57, immunoglobulines, isotypes, lymphocytes B, neutralisation, inhibition

Abstract

The patients able to control HIV without treatment (HIV Controllers, HICs) represent a unique study group to identify immune responses associated with this control. In addition to the HLA-B*57 protective status, the humoral response could participate to this protection. I analyzed the B cell response, the isotypic characteristics and the functional antibody (Ab) responses induced in HICs compared to those of chronic progressors. In HICs, the anti-HIV memory B cells are preserved. Distinct Ab profiles are detected between HLA-B*57+ HICs (strong Fc-mediated activities, association between B cell frequency and neutralization), HLA-B*57- HICs (strong neutralization against several strains) and chronic progressors (high levels of anti-HIV immunoglobulins A, strong neutralization). Extensive characterization of the Ab responses in HICs will guide the development of new immunogens able to induce a protective humoral response by vaccination.

Key-words: HIV-1, HIV controllers, HLA-B*57, B cells, immunoglobulins, isotypes, neutralization, inhibition