

THESE

Présentée devant l'Université Jean Monnet – Saint-Etienne
École Doctorale - Science, Ingénierie, Santé

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Par **Fahd BENJELLOUN**

**Développement d'anticorps monoclonaux
humains de type IgA dirigés contre la partie C-
terminale de la protéine d'enveloppe gp41 du
VIH-1**

Présentée et soutenue publiquement le 08 juillet 2013

Jury:	Pr Michel Cogné,	Président du Jury
	Pr Francis Barin	Rapporteur
	Dr Andrea Cimarelli,	Rapporteur
	Pr Mario Clerici	Examineur
	Pr Christian Genin,	Directeur de Thèse
	Dr Stéphane Paul,	Co-directeur de Thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : A. CIMARELLI et F. BARIN les rapporteurs M. CLERICI, mon examinateur. Je remercie M. COGNE de présider le jury lors de ma soutenance de thèse, et de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je voudrais remercier Pr GENIN pour votre soutien, votre confiance, votre disponibilité et de m'avoir accueilli au sein de ce groupe le GIMAP ma deuxième famille.

Je remercie Stéphane d'avoir cru en moi, d'avoir mené ce projet avec moi, à tes côtés je me suis bonifié scientifiquement. Je te remercie pour les discussions, les coups de pression positifs, les conseils et tes encouragements.

Je remercie le P. LUCHT et son service de maladie infectieuse pour leur collaboration.

Je tiens à remercier Zéliha ORUC pour sa disponibilité sa sympathie et son investissement dans notre projet.

Je remercie l'équipe de l'IBS de Grenoble et tout particulièrement le Dr. THIELENS pour son énergie et sa grande disponibilité.

Je remercie Gaël CHAMPIER pour ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Herr Professor T. BOURLET pour sa sympathie, son amitié, nos discussions merci encore Thomas.

Je remercie Pierre FLORI de m'avoir donné l'opportunité de l'assister et de participer à ses enseignements

Je vous remercie M. POZZETTO, de m'avoir accueilli au sein de votre structure et m'avoir soutenu.

Je remercie mes grands acolytes d'abord Phil my partner, nos private jokes, tes conseils, ton soutien quand ça n'allait pas, nos pinthes de bière, no échanges de musiques de poésies et surtout de sciences. Mon nico et toute ton amitié nos délires, nos voyages et tout et tout. Alex mon amigo je te remercie pour tes blagues du matin ta bonne humeur et tout le temps qu'on a passé ensemble au labo et en dehors. Merci Charles-Antoines ton humour et ton amitié (c'est que pour le manuscrit que je dit qu'on est potes ☺). Enfin, Je remercie le sage Amadou pour beaucoup de choses mais lui il saura merci AK.

Enfin que serait un monde sans femmes, je remercie nos belles de ramener de la douceur à notre monde de chercheurs hirsutes mal léchés. Merci ma paupau, Hind, Blandine, Mariam, kim Ahn, Marie Ange, Agathe, Fabienne les filles d'à côté merci pour votre fraîcheur, votre amitié.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
Abréviations	6
Résumé	8
Abstract	8
Introduction.....	9
1- Le Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH)	12
1.1. Découverte du virus	12
1.2. L'origine du VIH.....	12
1.3. Diversité génétique et classification des souches de VIH.....	13
1.3.1. Famille des lentivirinae	13
1.3.2. Les groupes et clades du VIH	14
2- Architecture moléculaire et cycle d'infection	15
2.1. Morphologie de la particule virale	15
2.2. La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1	16
A. La glycoprotéine d'enveloppe Gp120	17
1. Le site de liaison au récepteur CD4 (binding site)	19
2. Les co-récepteurs du VIH	20
3. Les récepteurs alternatifs	21
3.1. L'Interaction avec le Galactosyl-Céramide	21
3.2. L'interaction avec les lectines de type C	21
3.2.1 Lectine MMR	22
3.2.2 MBL	22
3.2.3 DC-SIGN.....	22
3.3. L'interaction avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$	22
B. La glycoprotéine d'enveloppe gp41	23
1. Le peptide de fusion	24
2. Les régions N-Heptad Repeat (NHR)/C-Heptad Repeat (CHR).....	25
3. Le MPER	27
4. Le domaine transmembranaire	27
5. Le segment C-Terminal ou queue intra-cytoplasmique (CT/ICS).....	28

Immunologie du VIH.....	31
1- La pathogénèse du VIH-1.....	31
2- Transmission du VIH.....	31
3- L'immunité anti-VIH.....	33
3.1 L'immunité innée.....	33
3.2 L'immunité innée des muqueuses.....	34
3.3 L'immunité adaptative ou acquise des muqueuses.....	36
4- La réponse humorale dirigée contre la glycoprotéine d'enveloppe du VIH.....	37
4.1 L'immunogénicité de la gp120.....	37
4.2 L'immunogénicité de la gp41.....	46
4.3 Conclusions.....	51
5- Rôle des IgA dans la réponse immunitaire anti-VIH.....	53
5.1. Structure et fonctions des IgA.....	53
5.2 Fonctions des IgA sécrétoires dans la réponse anti-VIH.....	53
6- Vaccination muqueuse anti-VIH.....	57
a. Qu'avons-nous appris de l'étude des candidats vaccin contre le VIH-1?.....	58
7- Conclusions.....	61
Projet de recherche.....	64
Résultats.....	66
A. Etude fonctionnelle des SIgA dirigées contre la gp41 dans une cohorte de sujets ESN.....	66
B. Développement d'IgA humanisées dirigées contre la gp41.....	75
Discussions et perspectives.....	106
1) Objectifs de recherche et principaux résultats obtenus.....	106
2) Discussions et perspectives.....	107
Références.....	117
Annexes.....	157
Annexe 1:.....	158
Annexe 2:.....	199
Annexe 3:.....	211

Abréviations

AcM: Anticorps monoclonaux
AcMNL: Anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre
AcNL: Anticorps neutralisants à large spectre
ADCC: Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
ADCVI: Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition
ADN: Acide désoxyribonucléique
APRIL: A proliferation-inducing ligand
ARN: Acide ribonucléique
BAF: B-cell activating factor
CCR5: CC (deux cystéines) chemokine Receptor
CD: cellule dendritique
CDR: Complementarity Determining Region
CDRH: Complementarity Determining Regions of antibody Heavy chains
CHO: Chinese hamster ovary
CPA: Cellule présentatrice d'antigène
CRF: Circulating Recombinant Forms
CT: Cytoplasmic tail
CTL: cytotoxic T lymphocytes
CXCR4: CXC chemokine Receptor
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin
FP: Fusion Peptide
Gp: Glycoprotéine transmembranaire
HAART: Highly active antiretroviral therapy
HB: helix bundle
HPLC: High Performance Low Chromatography
HR1, HR2: Heptad repeat 1, 2
HTLV: Human T-lymphotropic virus
IC50: Inhibitory Concentration of 50%
IC80: Inhibitory Concentration of 80%
INF α , β , γ : interferon α , β , γ
LTR: long terminal repeat en anglais
MIP-1 α et β : Macrophage Inflammatory Protein-1
MPER: Membrane proximal external region
MSD: Membrane Spanning Domain
NF: Negative factor
NK: Natural Killer cell
NRE: Negative Regulatory Element
NSI: No Syncytium Inducing virus
PID: Poly Immuno Dominant
PNH: Primates non-humains
RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and secreted
RE : Réticulum endoplasmique
RT : Reverse transcriptase ou transcriptase inverse

SI: Syncytium Inducting

SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquis

SIV: Virus de l'Immunodéficience simien (Simian Immunodéficience humaine)

SP: signal peptid

TAR: Tat-Activation-Response element

TH-1, 2: T-helper 1,2

TI: transcriptase inverse

TM : transmembranaire

TNF: Necrosis Factor

VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine

Résumé

La transmission du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) par voie sexuelle représente le mode majoritaire de contamination (80%) (UNAIDS). Ce mode de contamination implique le passage du virus à travers les muqueuses et une interaction avec les cellules épithéliales et les cellules immunitaires présentes au sein de ces muqueuses (cellules dendritiques, macrophages ou lymphocytes). Les muqueuses représentent le principal site d'exposition de l'organisme aux antigènes de l'environnement. Les SIgA (IgA sécrétoires) présentes dans la lumière de ces muqueuses représentent la première ligne de défense immunitaire contre l'infection et la colonisation des muqueuses. Les IgA sont capables d'interagir avec les glycoprotéines (gp) exprimées à la surface du VIH et de bloquer l'infection et/ou la transcytose à travers l'épithélium muqueux. Nous avons pu étudier la prévalence des SIgA anti-gp41 et plus précisément anti-MPER présentes dans la salive parotidienne de personnes Exposées au VIH Séronégatives (ESN) et leur rôle dans l'inhibition de l'infection par le virus *in vitro*. Nous avons pu démontrer que ces sujets présentaient un taux plus important de SIgA anti-MPER neutralisantes. Ce premier travail nous a permis de valider la gp41 comme immunogène d'intérêt pour la génération de SIgA neutralisantes. Nous avons pu générer des IgA1 dans un modèle murin $\alpha 1KI$ chimérique capable de produire des anticorps IgA1 humanisés. L'immunisation de ces souris a permis la production de 6 anticorps monoclonaux spécifiques de la région MPER capables de reconnaître des épitopes conformationnels élargis, correspondant aux épitopes reconnus par le 2F5 et le 4E10. Les IgA1 présentaient de fortes capacités neutralisantes pour différentes souches de laboratoire et de souches primaires du VIH. Les études de caractérisation des fonctions antivirales de ces anticorps permettront de mieux définir le mode d'action de ces anticorps. A notre connaissance, ces IgA1 neutralisantes anti-MPER sont les premières décrites à ce jour dans la littérature. De par leur faible immunogénicité et leur faible autoréactivité, ces anticorps peuvent facilement être intégrés dans des approches thérapeutiques locales ou par sérothérapie passive pour la protection après administration de SHIV dans des modèles animaux comme le macaque. L'ensemble de mes travaux de thèse ont confirmé l'intérêt thérapeutique potentiel des SIgA dans la lutte contre le VIH et notamment celles dirigées contre la partie gp41 de l'enveloppe

Mots clés : SIgA, gp41, ESN, souris humanisées $\alpha 1KI$, MPER, VIH.

Abstract

Sexual transmission of the Human Immunodeficiency Virus is the major mode of contamination (80%) for this pathogen (UNAIDS). This mode of transmission involves a passage of the virus through the mucosa and an interaction with epithelial cells and immune cells present in the mucosa (dendritic cells, macrophages and lymphocytes). Mucosa represents the major site of exposure for the organism to environmental antigens. The IgA expressed in the lumen of mucosa are the first line of immune defence against infection and colonization of mucosa. IgA are able to interact with glycoproteins (gp) expressed on the surface of HIV and prevent infection and/or block epithelial transcytosis. In this study we have investigated the prevalence of SIgA anti-MPER present in the parotid saliva of Exposed to HIV but Seronegative individuals (ESN). This study has allowed us to validate gp41 as an immunogen of interest for the generation of neutralizing IgA. IgA1 were generated in a chimeric mice model $\alpha 1KI$ that produced humanized IgA1 type antibodies. Immunizations of these mice has led to the elicitation of six monoclonal antibodies specific to the MPER region able to recognize extended conformational neutralizing epitopes of 2F5 and 4E10, two broadly neutralizing monoclonal antibodies specific to MPER. Elicited IgA1 have potent neutralizing properties for both laboratory and primary HIV strains. Characterization studies of the antiviral functions of these antibodies will further define the mode of action of these antibodies. To our knowledge, these anti-MPER humanized monoclonal neutralizing IgA1 antibodies are the first of this type described to date in the literature. By their low immunogenicity and autoreactivity, these antibodies can be easily integrated into local therapeutic approaches or passive serotherapy for protection in animal models such as the macaque challenged with SHIV. All the results of my PhD work confirm the great interest of gp41-specific SIgA as therapeutic agents against HIV.

Keywords: humanized mice $\alpha 1KI$, SIgA, gp41, MPER, HIV

Introduction

Depuis son identification au début des années 1980, le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) a fait plus de 25 millions de morts dans le monde. Aujourd'hui près de 35 millions d'individus vivent avec ce virus (dont 97% dans des pays aux faibles revenus) selon l'UNAIDS. La transmission par voie sexuelle représente le mode majoritaire de contamination (80%) (UNAIDS). Ce mode de contamination implique un passage à travers les muqueuses et une interaction avec les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires présentes au sein de ces muqueuses (cellules dendritiques, macrophages ou lymphocytes). Les muqueuses représentent le principal site d'exposition de l'organisme aux antigènes de l'environnement. Elles constituent la principale voie de pénétration d'agents infectieux, bactéries, virus, parasites ou champignons. Différentes propriétés du système immunitaire muqueux font de lui un système autonome capable d'interagir avec le système immunitaire systémique. En effet, les muqueuses sont protégées par des barrières physiques tels que le mucus ou le glycocalix qui empêchent le contact des agents infectieux avec les différentes muqueuses. Cette immunité innée est suppléée par une immunité plus spécialisée dite adaptative dont les effecteurs principaux sont les lymphocytes T et les immunoglobulines de classe IgA notamment les IgA sécrétoires. Ces anticorps représentent la première barrière pour tout agent pathogène susceptible de coloniser les muqueuses et de contaminer le reste de l'organisme.

Actuellement, les stratégies thérapeutiques les plus efficaces contre le VIH-1 restent les multithérapies antirétrovirales (HAART). Les molécules utilisées interviennent sur des points-clé du cycle de l'infection par le VIH-1 et surtout sur la machinerie interne des cellules infectées. Il est important de pouvoir développer de nouvelles stratégies vaccinales permettant de prévenir le processus infectieux en agissant plus en amont et notamment sur des étapes comme la reconnaissance, l'ancrage et la fusion du virus avec les cellules cibles. L'utilisation d'anticorps anti-VIH capables de neutraliser les particules virales lors de l'infection empêchant ainsi leur attachement et/ou leur fusion aux cellules cibles, apparaît comme une réelle voie d'avenir pour le développement d'un nouveau vaccin anti-VIH. Les résultats des études RV144 ou le protocole G de l'IAVI, ont démontré que certains patients VIH-1 séropositifs présentaient naturellement des anticorps neutralisants à très large spectre et dont l'efficacité de neutralisation couvre plus de 80% des souches virales circulantes. Ces anticorps sont dirigés contre les différentes régions de la glycoprotéine d'enveloppe du virus et peuvent très aisément être intégrés dans des vaccins anti-VIH. Cependant la plupart de ces anticorps sont de classe IgG alors que plusieurs auteurs ont démontré que les IgA sécrétoires (SIgA) sont fortement impliquées dans les réponses muqueuses anti-VIH par leur capacité de neutralisation mais aussi de blocage de la transcytose du VIH à travers la barrière épithéliale [1-9]. De plus, la présence de SIgA neutralisantes dans les sécrétions de sujets fortement exposés séronégatifs a été rapportée et représente un argument essentiel en faveur du rôle protecteur des SIgA au niveau des muqueuses et de l'intérêt de leur production lors d'une vaccination par voie locale [2, 8]. Il est actuellement admis qu'un vaccin efficace doit stimuler les défenses systémiques, en induisant de fortes réponses CTL, et locales (immunité muqueuse) en suscitant des réponses anticorps neutralisantes

notamment de type SIgA [10-13]. On peut émettre l'hypothèse que des IgA sécrétées anti-VIH apparues après vaccination par voie locale pourraient avoir un rôle protecteur contre la pénétration du virus par l'intermédiaire des muqueuses.

Le développement d'un vaccin prophylactique efficace, réside aussi dans le choix d'un immunogène capable de mimer conformationnellement des épitopes majeurs du VIH. Or, les particules virales du VIH, comme tout pathogène, présentent une multitude d'épitopes possibles. Cependant la variabilité génétique du virus et les modes d'échappement mis en place pour éviter et contourner les nouveaux anticorps produits par le système immunitaire de l'hôte poussent à la recherche plus fine d'immunogènes conservés donc fonctionnels et accessibles aisément aux anticorps neutralisants. Parmi les antigènes répondant à ces critères se trouvent les glycoprotéines d'enveloppe puisque ce sont les seuls motifs présents à la surface des particules virales et qui présentent plusieurs épitopes conservés. Ces glycoprotéines dérivent tout au long de l'infection et sont modifiées par glycosylation et les résidus glycanes à la surface de ces protéines créent un véritable « bouclier immunitaire » qui isole et masque certaines zones d'interactions nécessaires à l'ancrage sur les cellules cibles [14]. Toutefois, des épitopes conservés accessibles sont présents sur les glycoprotéines d'enveloppe du VIH notamment la région Membrane Proximal Ectodomain Region (MPER) [15]. Cette région est une cible idéale pour le développement d'un nouveau vaccin.

Etude bibliographique

En 2011, on estimait que, dans le monde, 35 millions de personnes vivaient avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Unaids). Cette même année, 1,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées dont 67% en Afrique subsaharienne (cf. figure 1). Actuellement, grâce à une meilleure prise en charge des personnes infectées et aux antirétroviraux, le nombre annuel de nouvelles infections a tendance à diminuer depuis le début des années 2000 (Unaids). Cependant, le SIDA demeure un fléau considérable surtout dans les pays émergents et un des plus grands challenges scientifiques que connaît notre ère.

1- Le Virus de l'immunodéficience Humaine (VIH)

1.1. Découverte du virus

Les premiers cas du « gay syndrome » ont été décrits en 1981, dans la communauté homosexuelle de San Francisco, suite à la recrudescence d'une maladie opportuniste, la pneumocystose. Plusieurs équipes se sont penchées sur la caractérisation de ce nouvel agent pathogène. En 1983, F. Barré-Sinoussi et coll. fut la première à isoler et identifier le virus responsable du SIDA comme étant un rétrovirus T-lymphotrope, ayant une activité de transcriptase inverse [16]. Par la suite, R. Gallo a décrit un virus proche de la famille des HTLV (Human T Lymphotropic Virus) qu'il a nommé HTLV-III [17-19]. A la même période, J.A. Levy identifiait un rétrovirus qu'il a nommé virus associé au SIDA [20 ; 41]. En 1986, le comité international de la taxonomie des virus a recommandé de nommer le virus du SIDA, le VIH [21]. En 2008, à l'occasion du 25^{ème} anniversaire de la découverte du VIH, F. Barré-Sinoussi et L. Montagnier ont reçu le prix Nobel pour la découverte du virus.

1.2. L'origine du VIH

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'émergence de la pandémie liée au VIH. Cependant, différentes études s'accordent pour situer l'origine du VIH en Afrique centrale entre le nord du ZAIRE et l'OUGANDA [22-24]. En effet, le VIH et le Virus de l'Immunodéficience Simien (VIS) sont phylogénétiquement proches [24-25] et l'émergence de l'épidémie de SIDA semble coïncider avec une zone géographique où cohabitent des singes probablement porteurs du VIS et des populations locales qui se nourrissent ou ont des liens étroits avec ces animaux. Cette promiscuité a dû favoriser le passage d'une espèce à l'autre, accompagné de mutations du génome du VIS donnant lieu à l'apparition du VIH capable d'infecter les hommes [26-30]. Ainsi les premiers cas décrits avant l'explosion de l'épidémie dans les années 80 semblent se situer il y a 50 à 60 ans comme la découverte d'un patient en 1960 en Norvège [31] ou du sous-type C en Afrique au milieu des années 1960 [24] et enfin la première souche du sous-type B aux États-Unis autour de 1967 [32-33].

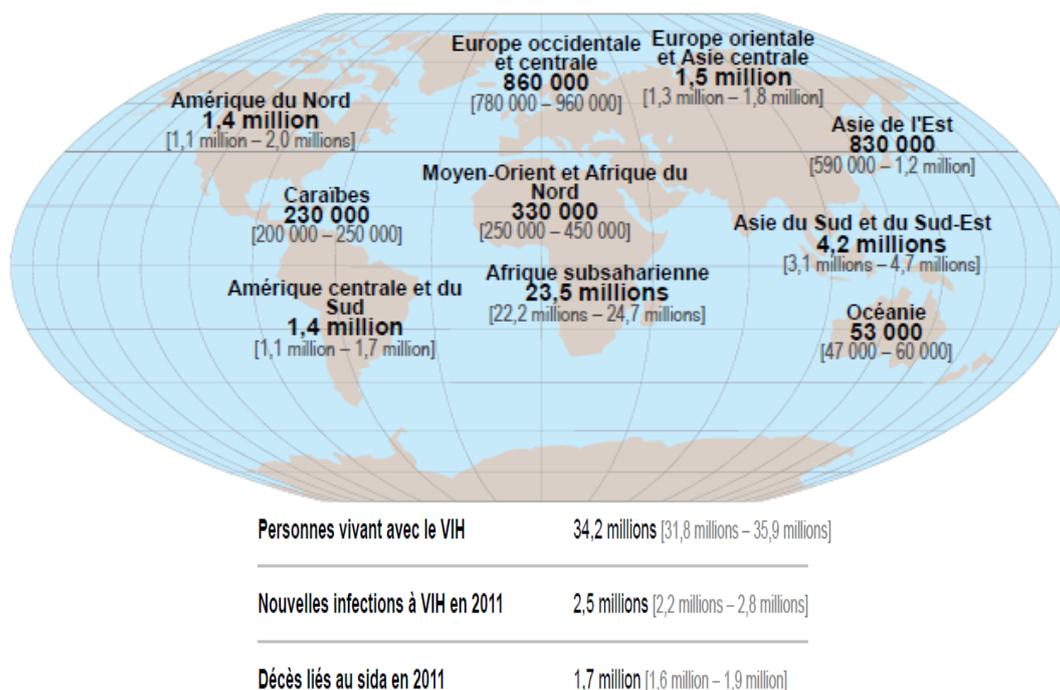


Figure1 : Estimation du nombre d'adultes et d'enfants vivant avec le VIH en 2011. (Adaptée de [34])

1.3. Diversité génétique et classification des souches de VIH

1.3.1. Famille des lentivirinae

Le VIH-1 est membre de la famille des Rétroviridae du genre des lentivirus, un rétrovirus de type C (classification basée sur la morphologie des rétrovirus en microscopie électronique). Comme tous les lentivirus, le VIH possède un génome composé de 2 molécules d'ARN monocaténaire et d'une polymérase spécifique, la transcriptase inverse (Figure 2). L'ARN viral est rétrotranscrit par cette enzyme en une molécule d'ADN intermédiaire qui est ensuite intégrée dans le génome de la cellule infectée.

Les lentivirus tirent leur nom de leur propriété à entraîner des pathologies chroniques à évolution lente, précédées d'une phase de latence clinique plus ou moins longue. Cette propriété est due à leur capacité d'infecter des cellules qui ne se divisent pas. Le génome des lentivirus contient tous les gènes nécessaires à l'expression des protéines virales. De plus, les lentivirus peuvent établir un état de latence dans les cellules infectées en réduisant l'expression des protéines virales. Cet état peut persister sur une longue période jusqu'à la réactivation du virus. Cependant, à l'échelle cellulaire, il est maintenant établi que l'infection par le VIH-1 provoque une destruction très rapide de la majorité des lymphocytes T mémoire CD4+ et notamment ceux résidant au niveau des muqueuses.

Hormis l'Homme, plusieurs mammifères peuvent être infectés par cette famille de virus, comme les primates (Simian Immunodeficiency Virus, *SV*), les gorilles (*SV_{gor}*, *SV gorilla*), les félins (Feline Immunodeficiency Virus, *FI*), les bovins (Bovine Immunodeficiency Virus, *BI*), les chèvres (Caprine Arthritis Encephalitis Virus,

CAEV), les moutons (Visna-Maedi Virus), les chevaux (Equine Infectious Anaemia Virus, EIAV).

1.3.2. Les groupes et clades du VIH

Le VIH-1 est présent dans le monde entier alors que le VIH-2 est surtout présent en Afrique occidentale [35]. Les deux virus montrent une organisation génétique similaire mais présentent des différences au niveau de certains gènes régulateurs et ne possèdent que 42% d'homologie génétique. Le VIH-1 est issu du chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* [36] et le VIH-2 du singe *Cercocebus torquatus* [35].

Selon l'analyse des séquences génomiques, le type VIH-1 est subdivisé en 4 groupes: le groupe M (Major), le plus répandu (plus de 11 sous-types), responsable de la pandémie du SIDA, le groupe O (Outlier), présent essentiellement au Cameroun, le groupe N (Non M-Non O) qui a été très difficile à détecter puisque les kits de détection classiques ne relevaient pas d'anticorps contre ce groupe [37-38], enfin le groupe P a été isolé le plus récemment, en 2004, en France chez une camerounaise. En 2009, l'analyse de la séquence génomique de ce groupe a révélé une plus forte similarité avec un virus d'immunodéficience simien découvert récemment chez des populations de gorilles sauvages (SIVgor) que le SIVcpz issu de chimpanzés [39]. Le VIH-2 est divisé en 8 groupes (A à H) [40].

La distribution des génotypes de VIH est très hétérogène. Le sous-type B est le plus répandu et est lié à la majorité des cas d'infection relevés en Amérique, en Europe, en Asie et en Australie. Alors que des clades comme A, C, D et E se trouvent principalement en Afrique. Le sous-type C est responsable de 50% des cas d'infection au niveau mondial. Ce sous-type est principalement présent en Afrique Centrale et de l'Est ainsi qu'en Inde (cf. Figure 2). Cependant, la stabilisation de l'épidémie en Europe et en Amérique et l'apport de l'immigration ont fait que près de 40% des infections à VIH-1 sont désormais dues à des souches non-B, souvent recombinantes.

Le séquençage complet des génomes viraux a permis d'identifier des souches recombinantes de virus dites Circulating Recombinant Forms (CRF) qui apparaissent à la suite de recombinaisons chez des sujets co-infectés par des sous-types différents de VIH-1. Ces CRFs sont des souches non reliées épidémiologiquement et définies par la présence de séquences phylogénétiquement distantes dans différentes parties du génome, non liées géographiquement. A ce jour, 43 formes circulantes différentes ont été reconnues et le nombre de sous-types CRF déposés ne cesse d'augmenter (6 en 1999, 19 en 2005). Il existe également un grand nombre de souches dites URF pour Unique Recombinant Forms qui correspondent à des recombinants mineurs reliés entre eux sur le plan épidémiologique et n'ayant pas fait l'objet d'une large dissémination géographique.

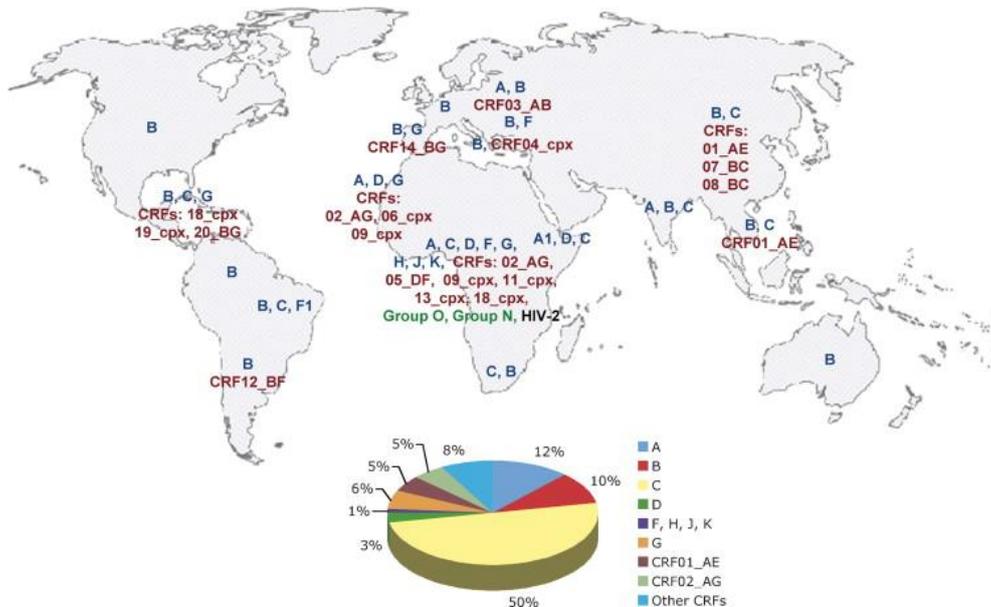


Figure 2: Distribution géographique des types génétiques du VIH. Les groupes VIH-1 M purs (“non-recombinants”) sont en bleu, les CRFs sont en rouge. Les autres groupes de VIH-1 et VIH-2 sont en vert et en noir, respectivement. Le graphique du bas montre la prévalence des formes génétiques issues du groupe M; la prévalence de chaque sous-type ou CRF est exprimée en pourcentage du nombre total d’isolats issus du groupe M identifiés au niveau mondial [41-42].

2- Architecture moléculaire et cycle d’infection

2.1. Morphologie de la particule virale

Le VIH est un rétrovirus enveloppé de type C (selon la classification basée sur la morphologie des rétrovirus par microscopie électronique) de la famille des Rétroviridae. Le virus possède un aspect sphérique d’un diamètre de 90 à 120 nm [43]. Au centre de la particule virale se trouve une capsidie en forme de trapèze constituée de la protéine p24 (CA). A l’intérieur de celle-ci se trouvent deux molécules d’ARN identiques de 9,6 kb, complexées avec la protéine de la nucléocapsidie p7 (NC) et des molécules de cyclophiline A d’origine cellulaire. A l’intérieur de l’enveloppe virale, se trouve la protéine de la matrice p17 (MA) ancrée à celle-ci par des groupements myristil (cf. Figure 3). Le VIH est considéré comme un virus enveloppé car sa nucléocapsidie est entourée d’une bicouche lipidique emportée lors du bourgeonnement du virus. Parmi les éléments cellulaires compris dans l’enveloppe virale (actine, ubiquitine, molécules du complexe majeur d’histocompatibilité, ICAM-1) se trouve la glycoprotéine d’enveloppe 160, la gp160, composée de gp120 dite SU en surface et de gp41 transmembranaire. La gp 160 se présente sous forme d’homotrimères insérés dans l’enveloppe virale qui sont impliqués dans la fusion avec les cellules cibles. D’autres protéines sont contenues dans les particules virales, comme les enzymes indispensables au cycle infectieux et les protéines accessoires. Les 3 enzymes virales essentielles sont : p66/p51 (RT, transcriptase inverse) qui transcrit l’ARN viral en ADN, lap32 (IN, intégrase) qui intègre l’ADN viral à l’ADN cellulaire et la p12 (PR, protéase) qui participe à l’assemblage et à la maturation des particules virales.

Enfin, les protéines régulatrices « accessoires » Vpr, Nef, Vif, Tat, Vpu et Rev dont les fonctions affectent la réplication virale de différentes manières (cf. Figure 3).

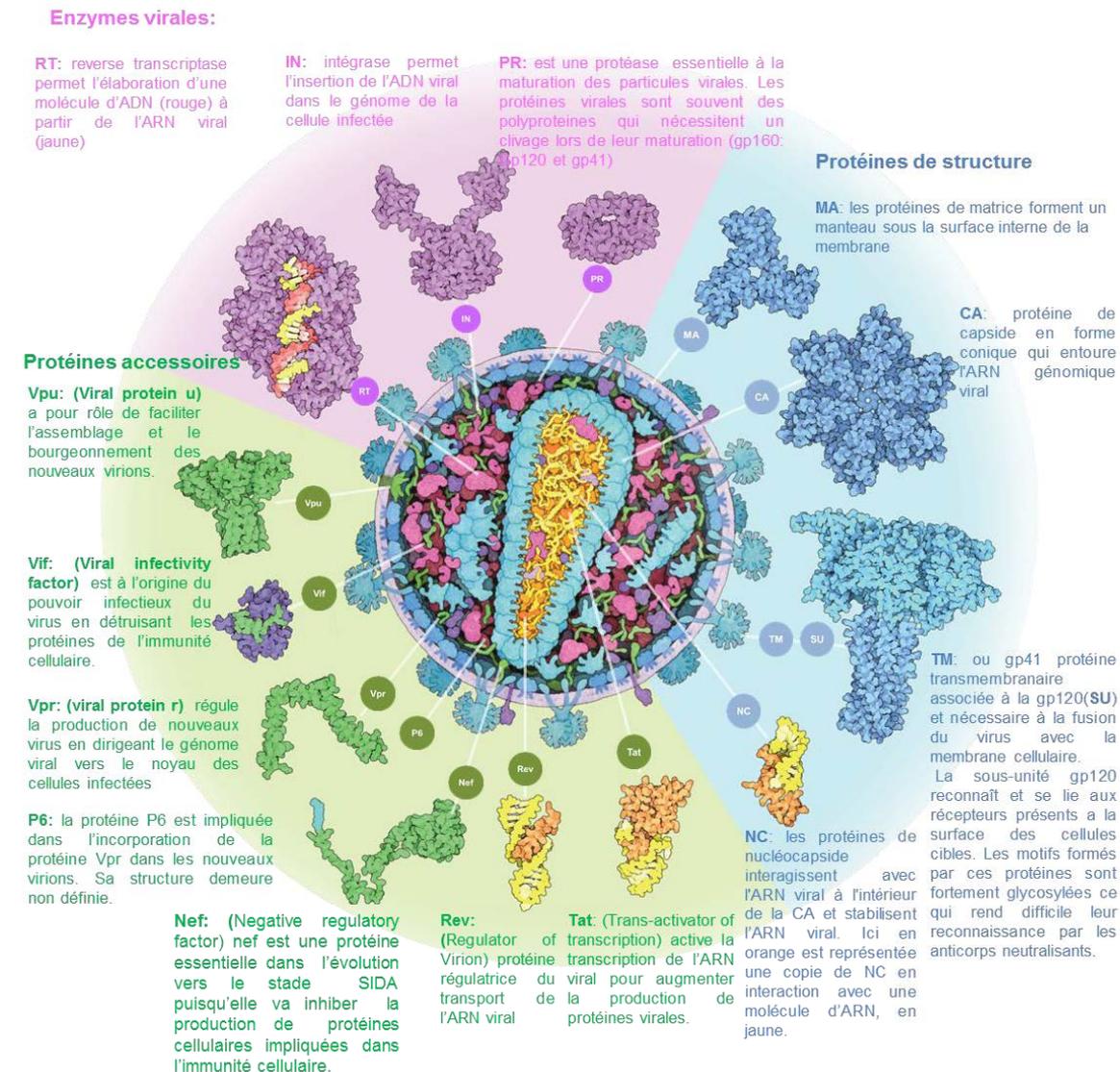


Figure 3: Structure d'une particule virale du VIH-1. adaptée de [44]

2.2. La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1

Les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 sont codées par le gène viral *env*. Ce gène code une polyprotéine précurseur (p90) qui subira plusieurs modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations et donnera naissance à un précurseur de la gp160. Il est intéressant de noter que la séquence du site de clivage est très conservée et est incluse au sein d'un des domaines les plus conservés de la gp120 (C5) [46]. Quand la gp160 est synthétisée, elle est produite sous forme d'un précurseur inactif dans le réticulum endoplasmique rugueux et subit une N-glycosylation importante où des chaînes oligosidiques de mannose se lient aux asparagines présentes dans des séquences Asn-X-Thr ou Asn-X-Ser.

La gp160 est sécrétée via la voie de sécrétion constitutive des cellules infectées [47]. Une fois transportée au niveau de la membrane plasmique cellulaire, le complexe

gp120/gp41 est incorporé en trimères dans la membrane constituant de nouvelles particules infectieuses. Avant d'être ancrée à la surface, la gp160 est clivée en deux sous-unités associées par des liaisons non-covalentes (gp120 à la surface et la gp41 transmembranaire) par une protéase nommée furine [48]. Les glycoprotéines de l'enveloppe forment des spicules trimériques de gp120-gp41 à la surface du virus lui conférant son tropisme viral [49]. La glycoprotéine Env est aussi impliquée dans l'interaction, la reconnaissance et la fusion des membranes virale et cellulaire menant à l'introduction du génome viral dans le cytoplasme des cellules cibles. Le format en trimères des spicules de l'Env est proposé Figures 4 et 5. La tomographie cryo-électronique montre des complexes hétérotrimériques [50-51]. Cependant, malgré des efforts intenses, l'arrangement et l'orientation de la structure atomique de la gp120 déléguée de ses boucles dans une structure native et son association avec les sous-unités de la gp41 reste largement spéculatifs.

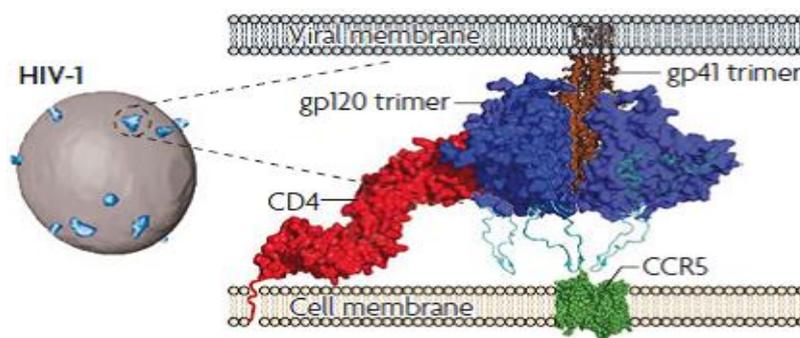


Figure 4: Représentation schématique de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe et les récepteurs viraux. A gauche, une image de tomographie cryo-électronique du VIH-1. Les spicules viraux sont en bleu et la surface virale, en gris. A droite, un modèle de glycoprotéine d'enveloppe du VIH. La glycoprotéine gp120 trimérique se lie à son récepteur primaire, CD4, en rouge. Après les changements conformationnels, le complexe gp120/CD4 lie le récepteur chimiotactique [6].

L'entrée du virus dans les cellules cibles implique la fusion de la membrane cellulaire et de l'enveloppe virale. Cependant, la reconnaissance de la cellule cible par la gp120 n'est pas suffisante pour entraîner directement la fusion de la membrane et permettre l'injection du génome viral. L'absorption du VIH-1 dans la surface de la cellule est induite par les interactions entre les glycoprotéines de la membrane et deux types de molécules de surface : les facteurs d'attachement (ou récepteurs d'adhésion) et les corécepteurs (Figure 4). Les corécepteurs sont très impliqués dans la pénétration du virus et sont sélectifs pour l'entrée du virion dans les cellules hôtes selon leur tropisme.

A. La glycoprotéine d'enveloppe Gp120

La glycoprotéine gp120 représente la partie externe de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH avec un poids moléculaire de 120 kDa. Elle compte 480 acides aminés avec 9 ponts disulfures et 20 à 24 sites de N-glycosylation. La Gp120 est impliquée dans les étapes précoces de l'infection des cellules cibles. La liaison du

VIH à son récepteur est médiée par la partie externe de la gp120, qui se lie au CD4 des cellules cibles. Une série de changements conformationnels de l'enveloppe aboutit à l'exposition d'un site de liaison transitoire, permettant au virus d'interagir avec son corécepteur, habituellement les récepteurs de chemokines CCR5 ou CXCR4, initiant ainsi un autre cycle d'infection (Figure 5A, B). La gp120 du VIH est composée de 5 domaines conservés (C1-C5) et de 5 domaines extrêmement variables (V1-V5). Les domaines conservés constituent le noyau de la gp120, tandis que les domaines variables (et les nombreux sites de N-glycosylation) sont localisés près de la surface de la molécule. La gp120 est largement glycosylée par les N-glycanes dérivés des carbohydrates de la cellule-hôte. Le rôle de ces modifications est de les masquer et leur micro-hétérogénéité sert à la protection (bouclier) qui permet une résistance à la réponse immunitaire contre les particules virales [14]. La présence des sites de glycosylation dans la région V3 semble affecter le tropisme viral. La suppression du site de glycosylation à la position 301 permet au virus chimérique de développer un phénotype X4 [52]. La suppression de 3 acides aminés sur les différents sites de glycosylation de la gp120 au niveau de la souche VIH89.6 dont le tropisme est X4R5 aboutit à la perte du tropisme pour CCR5 [53]. Ce phénomène peut être dû au démasquage des acides aminés basiques voisins ou à la perte des charges négatives localisées au niveau de la glycoprotéine. De plus, le nombre de glycosylations présentes dans la gp120 influence sa structure secondaire, ce qui pourrait changer les interactions entre la région V3 et les régions voisines (Figure 5, F). La capacité de certaines souches d'être infectieuses et de se reproduire même en l'absence de la boucle V3 a été décrite [54-55]. La région V3 (35 acides aminés) joue un rôle significatif dans la reconnaissance et l'interaction avec les récepteurs cellulaires des cellules cibles. Cette région contient aussi à son extrémité une séquence très conservée d'acides aminés (GPGRAF). Ce motif est entouré par des acides aminés variables qui altèrent le tropisme viral à travers l'interaction de la gp120 avec les récepteurs de chémokines CCR5 et CXCR4. Les régions V1-V5 forment des boucles exposées attachées à leurs bases par des ponts disulfures [56]. La structure cristalline de la gp120 montre que cette protéine est repliée en une connexion de quatre feuillets β dit « bridging sheet » avec un domaine interne et externe [57]. Le domaine interne est le point de contact le plus proche entre la gp41 et les extrémités N et C-terminales de la gp120. Dans la conformation native, les trimères sont plus stables grâce à l'interaction entre la gp41 et les boucles V1-V2. La protéine oligomérique gp120 peut adopter une conformation appelée « fermé » comme dans les isolats primaires résultant du masquage du site de liaison du récepteur CD4 au niveau de la région V1/V2. Tandis que la gp120 des virus TCLA adopte de préférence une forme « ouverte » réduisant leur affinité avec ce récepteur. Finalement, l'interaction avec le CD4 provoque une structure ouverte permettant la liaison entre les membranes virale et cellulaire et l'exposition de la boucle V3 [50].

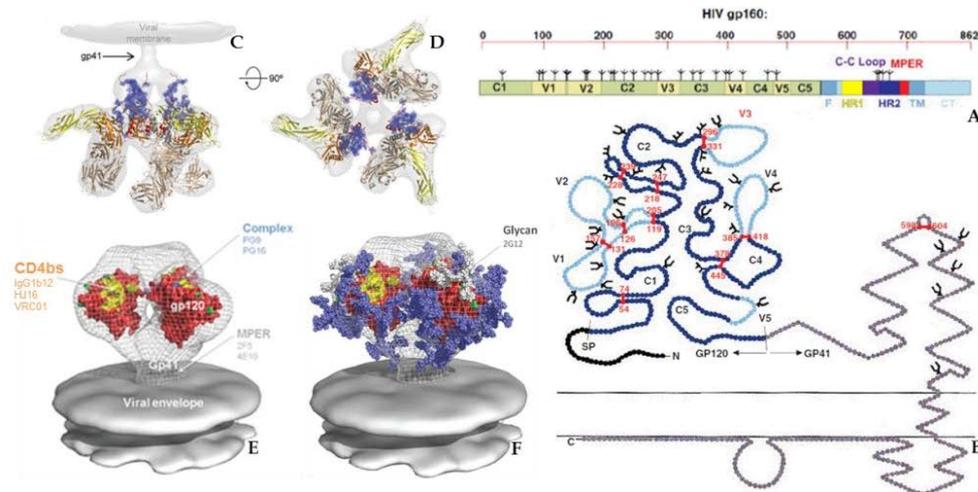


Figure 5: Représentation schématique de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. A) les sites de glycosylation présents au niveau de la gp160. B) la structure de la glycoprotéine gp120-gp41 du VIH-1 [58]. C, D, E, F ont été obtenus par tomographie cryo-électronique. C) la structure de la région d'interaction du noyau de la gp120 du VIH avec une gp41 intacte. D) rotation de 90° du placement dans C du complexe gp120-CD4 dans la carte de densité électronique (gris clair), les résidus impliqués dans l'interaction de la gp41 sont colorés en bleu [14] E) représentation schématique du pic viral natif du VIH-1. La glycoprotéine est indiquée sous forme d'une structure transparente et représente trois molécules de gp120 liées de façon non-covalente à 3 gp41. Les épitopes des anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre présents sur la gp120 (rouge) ou la gp41 sont indiqués par des flèches. La surface de liaison de l'IgG1b12 est indiquée en jaune, et les bases des régions variables (qui manque dans cette structure) sont indiquées en bleu, vert et rose (F). Le même modèle avec les glycanes de la gp120 indiqués en bleu révèle qu'une glycosylation massive de l'enveloppe est un mécanisme de résistance aux anticorps et les glycanes impliqués dans la liaison du 2G12 sont surlignés en blanc et indiqués avec une flèche [59].

1. Le site de liaison au récepteur CD4 (binding site)

Le principal récepteur du VIH est le CD4. La liaison avec le CD4 initie le processus d'infection. Différents modèles décrivent la configuration exacte de certaines régions de la protéine gp120 alors qu'ils montrent tous clairement les différences structurales importantes dans l'organisation du trimère entre les formes libre et liée associées au CD4. Le CD4 se lie avec une grande affinité à la protéine gp120 [60]. Le site de liaison du CD4 est composé de régions relativement conservées localisées entre 2 domaines de la gp120 et les inter-domaines du feuillet β . Les zones de contact sont discontinues dans la structure native en 3D de la protéine. Le domaine de liaison au CD4 est localisé dans le domaine D1 de la boucle CDR2 (Complementarity Determining Region 2), sur le côté opposé du domaine de liaison de HLA type II [61]. Dans cette zone, 2 résidus, Phe⁴³ et Arg⁵⁹, sont particulièrement importants dans l'établissement d'interactions avec les résidus de la gp120 du site de liaison du CD4 (incluant Glu³⁷⁰, Trp⁴²⁷ et Asp³⁶⁸) [62]. L'affinité de CD4 pour la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH est fortement variable selon sa structure quaternaire (monomérique ou oligomérique) et son tropisme. De plus, la gp120 est

conformationnellement flexible alors que le site d'attachement initial au CD4 est conformationnellement inerte [50; 63-64].

2. Les co-récepteurs du VIH

Les deux principaux co-récepteurs du VIH sont les co-récepteurs des chémokines CXCR4 et CCR5 (Figure 9). Ils sont exprimés ubiquitairement sur les cellules immunes. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs liés à la protéine G et sont caractérisés par une structure comprenant un segment N-terminal, 7 domaines transmembranaires en hélice, 3 boucles extracellulaires ou ECL (Extra Cellular Loop), 3 boucles intracytoplasmiques ou ICL (Intra Cellular Loop) et un segment C-terminal intracytoplasmique. Le segment N-terminal et les boucles extracellulaires sont responsables de l'affinité du récepteur pour son ligand [65-66].

Le ligand naturel de CXCR4 est la molécule SDF-1 (Stromal Derived Factor-1), une chémokine α de type CXC (présence de 2 cystéines séparées par un acide aminé). Comme un ligand, elle induit l'internalisation de CXCR4 par un processus d'endocytose de vésicules clathrine-dépendant, menant à sa dégradation. CCR5 est le récepteur de 3 chémokine β de type CC (avec 2 cystéines adjacentes), toutes produites par les lymphocytes T CD8, RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), MIP-1 α et β (Macrophage Inflammatory Protein-1). RANTES induit l'internalisation de CCR5 qui est recyclé au niveau de la membrane cellulaire sans être dégradé. Selon le co-récepteur impliqué dans l'entrée du VIH dans la cellule cible, le virus est classé d'après son tropisme. Ainsi, les virus utilisant le co-récepteur CCR5 (exprimé par les monocytes, macrophages, cellules T activées ou mémoire et les cellules dendritiques (CDs)) sont appelés « CCR5-tropic » (ou virus de type « R5 ») et ceux utilisant le co-récepteur CXCR4 (exprimé par les cellules T, monocytes et les cellules dendritiques) sont nommés, CXCR4-tropic (ou virus de type « X4 »). CXCR4 est le co-récepteur responsable de l'entrée du VIH dans les lignées lymphoïdes adapté des virus X4 est aussi appelé « T-tropic » ou « lymphocytotropic », tandis que les virus R5 sont appelés « M-tropic » ou « monocytoprotropic ». Certains isolats sont capables d'utiliser tant le co-récepteur CXCR4 que CCR5 et sont appelés « X4R5 » ou « dual-tropic ». Cette classification a remplacé une vieille classification basée sur la capacité ou pas du virus à induire la formation de syncytia (une réaction aboutissant à la fusion de la membrane cytoplasmique de plusieurs cellules adjacentes menant à la formation d'une « cellule géante » multinucléée dans les lignées cellulaires T) (MT-2). Il est maintenant accepté que les virus utilisant le co-récepteur CXCR4 pour entrer dans les cellules cibles induisent la formation de syncytia (SI virus like « Syncytium Inducing virus ») contrairement aux virus utilisant exclusivement CCR5 (NSI virus pour « No Syncytium Inducing virus »).

3. Les récepteurs alternatifs

Les cellules qui n'expriment pas la molécule CD4 à leur surface peuvent aussi être infectées, au moins *in vitro*. Le CD4 n'est pas la seule molécule favorisant l'infection par le VIH-1.

3.1. L'interaction avec le Galactosyl-Céramide

Les molécules de surface comme l' α -Galactosyl-Céramide (α -GalCer) ou le lactosylcéramide sulfate, présentes dans différents tissus (cerveau, intestin, épithélium et col de l'utérus) sont capables de se lier à la boucle V3 de la protéine gp160. Ces molécules peuvent être considérées comme des récepteurs alternatifs pour le VIH. L' α -GalCer est un glycosphingolipide (GSL) le plus souvent impliqué dans les interactions entre les cellules n'exprimant pas le CD4 et le VIH. Il se lie à la région V3 de la gp120 [67]. Ses séquences forment un site conformationnel exposé à la surface de la gp 120 qui interagit avec le résidu galactose du GalCer. L'affinité de la gp120 pour le GalCer est plus élevée que pour les autres GSL [67]. La saturation de la boucle V3 de la gp120 avec les analogues du GalCer peut empêcher l'infection des lymphocytes T CD4⁺ et T CD4⁻ par le VIH [68]. GalCer est aussi capable de se lier au domaine de la gp41 situé dans une région de 35 acides aminés contenant l'épitope ELDKWA [69]. Cette interaction a lieu seulement après la fixation à la gp120 et la stabilisation de GalCer. L'interaction α -GalCer/gp120 ou gp41 est ainsi essentielle pour la transmission des particules virales durant l'endocytose ou la transcytose. Les GSL sont constitutifs de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire et sont associés aux glycopospholipides (LPG) et au cholestérol. Cette association forme, au sein de la membrane, des microdomaines distincts appelés radeaux lipidiques ou 'rafts' [70]. Divers pathogènes ou leurs toxines utilisent les éléments lipidiques ou protéiques de ces microdomaines comme récepteurs pour passer à travers les membranes cellulaires [71]. Les radeaux lipidiques sont impliqués dans le cycle d'infection du VIH, particulièrement dans l'entrée dans les cellules cibles [72]. Dans le cas des infections CD4-dépendantes et après fixation de la gp41 au CD4, l'interaction entre la portion centrale de la région V3 et le GSL serait essentielle pour l'association entre la gp120 et les corécepteurs [73]. Les GSL présents dans les radeaux lipidiques peuvent stabiliser l'attachement du virus à la surface de la cellule et assurer la migration du complexe gp120-CD4 vers les corécepteurs. Les rafts peuvent se déplacer dans la membrane et faciliter le changement conformationnel de la gp120 menant à l'insertion du peptide de fusion.

3.2. L'interaction avec les lectines de type C

Les lectines de type C (CLR, C-type Lectin Receptor) sont des protéines qui s'attachent, de manière calcium-dépendante, aux résidus carbohydrates à travers leur domaine CRD (Carbohydrate Recognition Domain). Elles sont surtout exprimées au niveau des cellules dendritiques où elles jouent un rôle-clé dans la capture des pathogènes en fixant les carbohydrates présents au niveau des micro-organismes [74]. Il y a deux catégories de CLR : les CLR de type I qui exposent leur partie N-

terminale à l'extérieur des cellules et les CLR de type II avec un domaine N-terminal intracellulaire. La majorité des CLR lie le D-mannose, le D-glucose ou le D-galactose et leurs dérivés. Quatre CLR de type lectine ont la capacité de se lier à la gp120 : MMR, MBL, DC-SIGN et Langerine.

3.2.1 Lectine MMR

La lectine MMR (Macrophage Mannose Receptor, ou CD206) est fortement exprimée par les cellules dendritiques générées *in vitro* à partir des monocytes mais non exprimée par celles du sang. Les macrophages sont capables de transférer le VIH aux cellules exprimant le CD4 en utilisant ce récepteur [75].

3.2.2 MBL

La lectine MBL (Mannose Binding Lectin) est une CLR de type I présente dans le sérum sous forme soluble qui peut se lier aux pathogènes et initier leur attaque par le système du complément. Elle est capable de se lier au VIH par l'intermédiaire des résidus fortement mannosylés présents dans la gp120 [76].

3.2.3 DC-SIGN

Le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin, or CD209) est une CLR de type II, exprimée sous forme de tétramères au niveau des radeaux lipidiques des cellules dendritiques immatures [77]. Son ligand naturel est l'ICAM-3 (Intercellular Adhesion Molecule-3 ou CD50), présent dans les cellules T, qui permet son interaction avec les cellules dendritiques [78, 79]. Comme MBL, DC-SIGN lie les résidus mannose incorporés dans des motifs plus internes et plus complexes que MMR. DC-SIGN se lie à la gp120 de souches du VIH et du SIV qui présentent plusieurs oligosaccharides riches en résidus mannose [78]. Finalement, la langerine (ou CD207) est un récepteur de type CLR, spécialement exprimée par les cellules de Langerhans. La langerine est responsable de la formation des granules de Birbeck [80] et contient une région spécifique qui interagit avec la gp120 [81].

3.3. L'interaction avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$

Il a été récemment démontré que la forme activée de la gp120 peut aussi se lier à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée sur les lymphocytes T et B intestinaux de « homing » muqueux ainsi que sur les cellules T CD4⁺ NK (Figure 4). La boucle tripeptide (Leu-Asp-Val) au niveau de la boucle V2, mimant le motif de liaison des ligands naturels de l' $\alpha 4\beta 7$, est impliquée dans cette interaction. Cette liaison permet la formation de la synapse virale par l'activation de LFA-1 [82]. Ainsi, VIH-1 induit une déplétion massive des cellules T CD4⁺ intestinales ce qui participe au déficit immunitaire chez les patients VIH⁺.

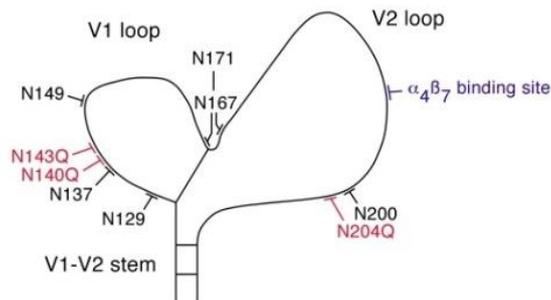


Figure 6: La position probable des N-glycosylations et des sites de liaison de $\alpha_4\beta_7$ est située dans la boucle V1/V2 de la gp120 [83].

B. La glycoprotéine d'enveloppe gp41

La liaison de la gp120 au CD4 et aux corécepteurs permet leurs changements conformationnels et déclenche la formation d'un complexe de fusion fait de trimères de gp41 (Figure 6) [84-86]. La gp41 est le domaine transmembranaire de la glycoprotéine d'enveloppe qui lie les spicules viraux à la bicouche lipidique des particules virales et joue un rôle important dans la fusion de la membrane et dans l'entrée du VIH dans la cellule. La gp41 est composée de 35 acides aminés (512 à 856 dans la souche HXB2 du VIH) avec une masse moléculaire d'environ 41KDa. La gp41 présente un domaine extracellulaire ou ectodomaine, le domaine transmembranaire ou MSD (Membrane Spanning Domain) et le domaine intracytoplasmique (Figure 7). Les séquences de la gp41 sont nettement plus conservées que celles de la gp120 et contiennent seulement 4 sites de N-glycosylation dans l'ectodomaine. Ces sites de glycosylation sont très conservés et apparaissent contribuer à la réplication optimale du virus [87].

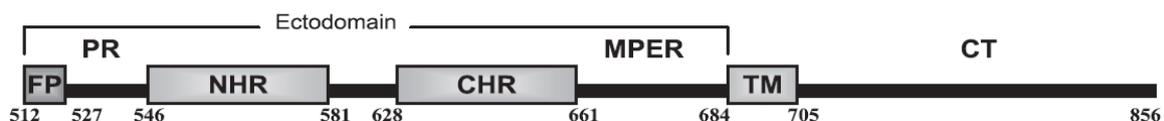


Figure 7: Représentation schématique de la gp41. La gp41 est divisée en 3 régions : l'ectodomaine contient le peptide de fusion (FP), la région polaire (PR), les régions N et C-terminales (heptad repeat) séparées par une région immunodominante (NHR & CHR), la région riche en tryptophane hautement conservée (MPER), la région transmembranaire (TM) et une queue intracytoplasmique (CT) [88].

La gp41 abrite différents domaines impliqués dans le processus de fusion des membranes cellulaires. La région hydrophobe N-terminale consiste en un peptide de fusion (512–527), une région polaire (525-543) nommée Fusion Peptide Proximal Region (FPPR) ou la région polaire (PR), la N-terminal Heptad Repeat (NHR ou HR1) (546– 581) et la C-terminal Heptad Repeat (CHR or HR2). Ces régions sont repliées en hélice α et liées par une boucle dite immunodominante (598-604) contenant des ponts disulfures. La Membrane Proximal Ectodomain Region extern (MPER) riche en tryptophane et hautement conservée (660-683) est aussi présente

[89-90]. Le domaine transmembranaire ou Membrane Spanning Domain (MSD/TM) et le segment intracytoplasmique ou C-tail sont deux autres régions hydrophobes présentes dans la portion C-terminale de la gp41 (Figure 7). La structure complète de la molécule gp41 n'est pas encore complètement décrite. Un trimère intact cristallisé pourrait être structurellement défini, mais il semble que de larges régions sont en mouvement constant dans le cadre de la défense par masquage conformationnel des épitopes potentiels des anticorps. Il est largement admis que l'échec des vaccins candidats basés sur l'enveloppe tient à la difficulté de produire des versions solubles de la protéine d'enveloppe imitant fidèlement les caractéristiques structurales d'une enveloppe native in situ.

1. Le peptide de fusion

Le peptide de fusion (FP) correspond au premier domaine N-terminal de l'ectodomain de la gp41 (Figure 7). Le FP est hautement conservé dans plusieurs clades de VIH-1 et d'autres virus. Par exemple, GFLG est un motif présent dans les peptides de fusion de différents rétrovirus comme VIH-1, VIH-2, SIV et HBV [90]. Une mutation au sein de GFLG altère la capacité de fusion du FP [91]. D'autres études sur le VIH avec des FP tronqués ou mutés ont démontré qu'il était crucial pour le processus de fusion et l'entrée du virus dans les cellules hôtes [92].

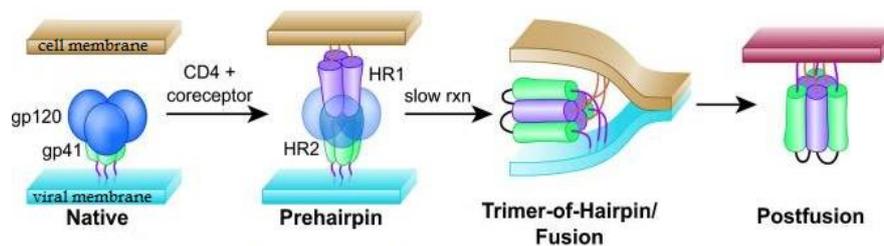


Figure 8: Modèle d'entrée du VIH et les conformations intermédiaires de la gp41. Les régions HR1 et HR2 de la gp41 sont indiquées respectivement en magenta et vert [93].

Le FP est en partie hydrophobe [94]. La substitution des résidus de glycine aboutit à une diminution de la capacité de fusion [95]. Il a été suggéré que la succession de glycine du FP est impliquée dans son oligomérisation, en rapport avec l'amphipathicité nécessaire pour la fusion des membranes et/ou l'orientation des peptides de fusion dans celles-ci [96]. Des études récentes ont montré que les FP peuvent changer de conformation selon leur environnement biochimique [97-98]. Par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire, il a été confirmé que les FP oscillent de l'état d'hélice α à basse concentration de cholestérol à la forme de volet β ce qui révèle son rôle important lors du processus de fusion virale [99]. Il y a aussi des controverses sur la structure fonctionnelle et la taille des FP qui pourraient avoir différentes longueurs et ainsi différentes séquences au niveau des acides aminés 16 [100], 23 [96 ; 101] ou 33 [91]. Jusqu'à présent la structure native dans l'état préfusogénique et fusogénique reste non résolue.

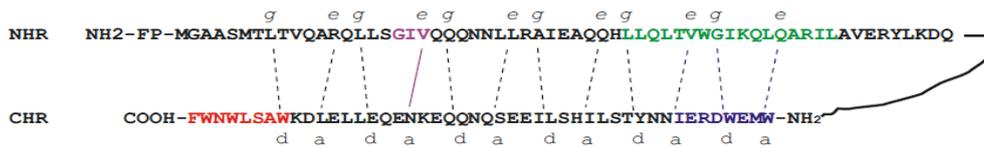


Figure 9 : Interaction entre les séquences critiques dans les régions NHR et CHR des formes intermédiaires de fusion de la gp41. Les lignes discontinues entre les domaines NHR et CHR indiquent l'interaction entre les résidus localisés aux positions e, g et a, d dans l'hélice spirale des domaines NHR et CHR, respectivement. Les séquences critiques dans NHR et CHR incluent GIV (les résidus 547-549, rouge) un déterminant de la résistance au T-20 dans la région NHR, LLQLTVWGIKQLQARIL (les résidus 565-581, vert), la séquence formant la cavité de liaison dans la région NHR, WMEWDREI (les résidus 628-635, orange), la séquence de la cavité de liaison dans le CHR, WASLWNWF (les résidus 666–673, rose) et une séquence partielle de la région riche en tryptophane [102].

2. Les régions N-Heptad Repeat (NHR)/C-Heptad Repeat (CHR)

Adjacente au FP, c'est la première des deux HR (N et C-HR, respectivement) qui jouent un rôle critique dans l'activité de fusion de la gp41 (Figure 7, 8). Les HR contiennent un motif caractéristique répété de 7 résidus (abcdefg). La séquence de ces segments est composée de 7 acides aminés qui occupent 7 positions dans la structure fusogénique formant ce motif. Ce motif se répète 7 fois d'où le nom seven-repeat (heptad repeat). Dans le CHR, les acides aminés en position « a » et « d » sont généralement apolaires ou hydrophobes et sont cruciaux pour la stabilisation des trimères (Figure 7, 8). Les résidus « e » et « g » dans NHR interagissent fréquemment avec les résidus en position « a » et « d ». L'assemblage caractéristique des chaînes latérales hydrophobes comme le HR dans la configuration de l'hélice stabilise la structure en super hélice du N-HR (aa 541-581). Deux sites de liaison ont été caractérisés qui lient la région CHR (aa 610-683) par les résidus « g » et « e » ou l'homotrimère endogène de la région NHR par les résidus « a » et « d » [103].

Une boucle hydrophile de 5 acides aminés contenant 2 résidus cystéine avec un pont disulfure intramoléculaire lie les 2 régions HR ensemble. Ces cystéines sont hautement conservées au niveau des rétrovirus. Il a été proposé que cette boucle crée une protrusion en forme de bouton 'knob-like' dans les sous-unités TM ce qui permet de s'intégrer dans la cavité 'socket' de la surface des sous-unités (Figure 8). Dans les études à haute résolution de la gp41, cette région apparaît désordonnée et peut mener à l'agrégation de la protéine [106]. La structure des formes de pré-fusion de la gp41 est indéterminée. Néanmoins, la structure cristalline de la gp41, les rayons X et les structures RMN décrivent un état en 6 hélices à l'état final.

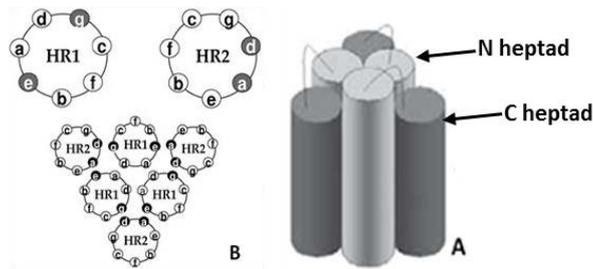


Figure 10: Représentation schématique de l'état fusogénique de la gp41 en 6 hélices (6HB). A) la description de la structure en 6 hélices : les régions N-(clair) et C-(sombre) heptad repeat qui se replie dans une forme antiparallèle (épingle à cheveux). Trois monomères du NHR forment un trimère en hélice α au centre en triple-volet "coiled-coil" et la région C-HR vient se lier aux sillons de cette structure pour former l'état final de 6HB. La liaison entre les 2 régions HR est impliquée dans l'agrégation de ce complexe [104] B) Vue d'ensemble de la représentation de la structure en 6 hélices. Trois NHR de chaque monomère gp41 forment des sillons dans lesquels viennent s'ancrer les CHR pour former la structure en 6 hélices bundle (6HB) [105]

Ces études révèlent que 3 NHR sont pliés au centre en triple-volet en spirale enroulée en hélices α et les 3 CHR sont assemblés en forme antiparallèle, comme l'hélice α dans 3 chaînes en super hélice (coiled-coil) (Figures 8, 9, 10A) [89].

Le trimère NHR en hélice de la structure 6HB a été utilisé pour modéliser l'état activé de la gp41 à la suite de sa liaison au récepteur. Ce trimère a aussi été utilisé pour reproduire plusieurs NHR en spirale enroulée qui peut potentiellement inhiber la fusion, comme les peptides T20 ou N36. Ce 6HB est thermiquement stable et peut être considéré comme la structure finale. A l'origine, la formation du 6HB a été acceptée comme le processus qui relie les membranes virale et cellulaire ensemble et permet l'agrégation de plusieurs complexes Env pour former des pores, menant à l'entrée de la nucléocapside dans la cellule [105].

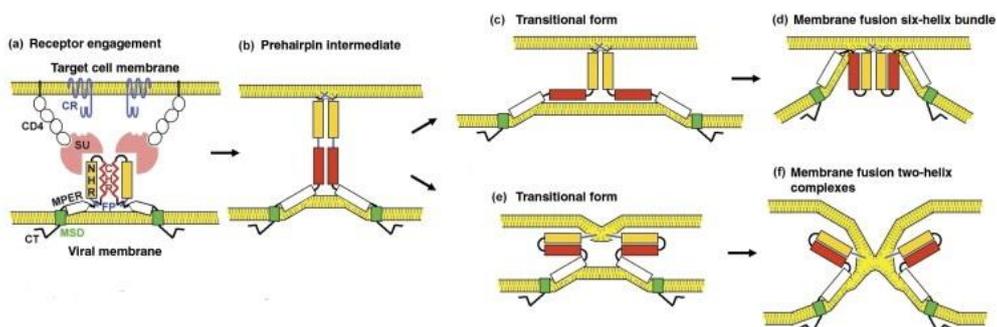


Figure 11 : Représentation schématique possible des aspects topologiques liés au mécanisme de fusion médiée par un seul picule. a, b) la gp120 interagit avec CD4 puis avec le corécepteur CR. La liaison du peptide de fusion permet un changement conformationnel et les régions HR forment des aspects en épingles à cheveux. c, d) le modèle où les changements conformationnels se déroulent facilement, mais exigent des cassures membranaires pour former le 6HB. e, f) le second modèle où les membranes restent intactes durant le repliement de la gp41. CHR et NHR se lient et forment des pores de fusion. NHR, or; CHR, rouge [50]

3. Le MPER

Le segment MPER ou Membrane Proximal Ectodomain/external Region est bordé par la région HR2 et le segment TM de la gp41 (Figures 7, 11). Cette région est riche en résidus tryptophane et interagit avec le cholestérol au niveau des bicouches lipidiques de la membrane cellulaire, jouant ainsi un rôle important dans le processus de fusion et l'infectivité du VIH-1 [84]. MPER semble être impliqué dans les étapes précoces de la fusion et la formation de syncytium [85].

Les mutations de MPER induisent une diminution de la capacité du virus à induire la formation de syncytium dans les cellules infectées ce qui est dû à l'incapacité à former des complexes de fusion [107-108]. MPER est très conservé et représente une cible majeure pour les thérapeutiques. La séquence du MPER (⁶⁶³ELDKWASLWNWFNITNWLWYIK⁶⁸³) est la même dans la majorité des souches VIH-1 et inclut les épitopes d'anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre (ELDKWA) pour 2F5 et WF (N/D) IT pour 4E10, Z13 et 10E8 décrit dernièrement (Figure 13) [109-111]. MPER a aussi été décrit comme hélice α ou comme un β -turn. Des études récentes ont révélé que MPER adopte une forme hélicoïdale qui est pliée et est un peu en forme de L et le segment qui contient l'épitope de 4E10 est incorporé dans la bicouche lipidique de la membrane [112, 113]. La structure de MPER dans un contexte lipidique est mieux connue, mais la question de sa structure native sur la surface cellulaire dans la gp41 reste ouverte.

4. Le domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire (TM) ou Membrane Spanning Domain (MSD) formé de 25 acides aminés (681 aa-705) est entouré sur sa partie N-terminale par le MPER et par le domaine intracytoplasmique au niveau de son extrémité C-terminale (Figures 5, 9). Cette région est intégrée dans la bicouche lipidique du virus et ancre la gp41 dans la membrane. Cette région est hautement conservée et est composée essentiellement d'acides aminés neutres et hydrophobes (Figure 11). Deux modèles ont été proposés pour expliquer la conformation de MSD : la conformation stable inclinée en hélice α et une conformation pliée et incurvée et le MSD semble passer de l'une à l'autre durant les changements conformationnels de la gp41 [114].

Le MSD contient 2 caractéristiques communes aux MSD de lentivirus : un résidu basique chargé Arg⁶⁹⁴ inséré dans la membrane de la bicouche lipidique [115] et un motif ⁶⁸⁸GXXXG⁶⁹⁴ hautement conservé. La perte de ce motif n'affecte pas la formation de la glycoprotéine du trimère Env pendant le transport du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Cependant, il altère la fusion membranaire et l'infection virale comme la perte de Lys⁶⁸¹, Arg⁶⁹⁴ ou Arg⁷⁰⁵ [115]. Le MSD ou TM joue un rôle important dans la fusion virale (Figure 11) [116,117]. Des études de tronquage de l'Env du VIH-1 révèlent que seulement 17 acides aminés (Lys⁶⁸¹-Ala⁶⁹⁷) sont nécessaires pour un ancrage stable de la gp41 dans la membrane et la médiation de la fusion d'une cellule à l'autre [118]. Des petites délétions (3 résidus d'acides aminés) dans la région entre Arg⁶⁹⁴ et Arg⁷⁰⁵ montrent la fusion normale d'une cellule à l'autre, tandis que des délétions larges sont plus délétères, suggérant que la longueur de cette région est plus importante que sa séquence en acides

aminés [119-120]. La substitution de tous les résidus leucine ou 2 autres résidus hautement conservés, Phe⁶⁸³ avec Val⁶⁸⁷, dans le noyau en l'hélice de MSD est critique pour la capacité de fusion et l'infectivité des complexes Env [115].



Figure 12: Séquence d'aa du « Membrane Spanning Domain »: la séquence consensus du MSD du VIH-1 est générée par l'alignement des séquences des MSD des Env de tous les groupes M et N des isolats de VIH-1 issues de la base de données de Los Alamos. Le graphique montre le pourcentage de résidus conservés parmi les isolats [115].

5. Le segment C-Terminal ou queue intra-cytoplasmique (CT/ICS)

Les lentivirus, incluant le VIH-1, ont des TM de glycoprotéine d'enveloppe (Env) avec des segments cytoplasmiques (CT) qui sont particulièrement longs comparés à d'autres rétrovirus. Le CT de la gp41 est remarquablement long et suit la MSD. Le CT est une région hydrophobe de 150 acides aminés insérés dans la membrane plasmique (Figure 11A, 13) [121]. Le CT contient 3 régions appelées « lytic lentiviral peptides » et forme des hélices amphipathiques. Les régions LLP1 et LLP2 ont des propriétés hautement hydrophobes. Il a été admis que le CT est entièrement contenu à l'intérieur de la cellule ou du virion [122-123]. Il a été montré qu'il y a des anticorps dirigés contre un épitope du CT et certains d'eux présentent des propriétés neutralisantes du VIH [124-131]. Par conséquent, les anticorps ne traversant pas la membrane, les virus infectieux sont par définition intacts, ceci suggère que la partie reconnue du segment est exposée à la surface du virion permettant aux anticorps de se lier et de neutraliser, contrastant ainsi avec la localisation intracytoplasmique traditionnelle de la totalité de la séquence C-terminale de la gp41 [132]. Plusieurs études ont tenté d'expliquer cette divergence entre l'ancien modèle d'une queue exclusivement intracytoplasmique et un modèle alternatif avec des segments externes du CT, comme le peptide Kennedy (aa 731-752) [133] contenant trois motifs, le motif conservé qui est le ⁷⁴¹EEEGGE⁷⁴⁶ et les deux autres ⁷⁴⁷QDRDRS⁷⁵² et ⁷³¹PRGPDRPGRI⁷⁴⁰. Lors des étapes précoces de l'entrée du virus, le CT est impliqué dans la régulation de la cinétique de fusion et dans la capacité de l'enveloppe à promouvoir des syncytia [134-136]. Les études de mutations ont révélé que les CT interagissent avec les domaines de la matrice comme la protéine p55 Gag durant le bourgeonnement et cette interaction est nécessaire pour l'incorporation dans l'enveloppe [137-138].

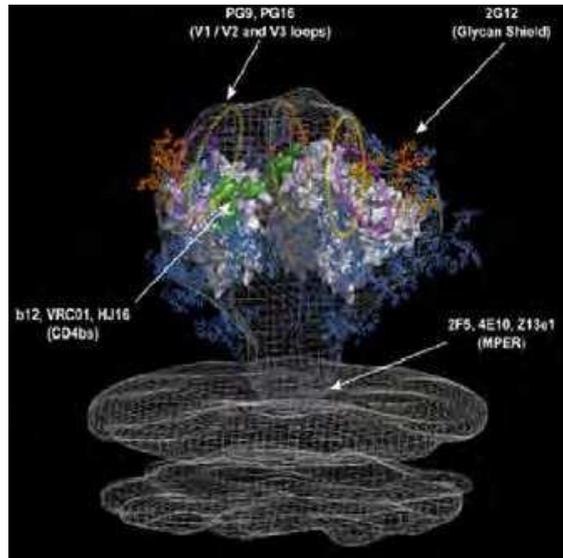


Figure 13: Modélisation des épitopes des anticorps neutralisants spécifiques des trimères du VIH-1. Ce modèle est adapté de récents travaux réalisés en tomographie de microscopie cryo-électronique de la structure des trimères du VIH-1[139-141]. La structure cristalline de la gp120 liée au B12 monomérique a été adaptée par carte de densité. Les boucles V1/V2 et V3 qui ne sont pas décrites entièrement sont présentées sous forme d'ovales jaune et magenta, respectivement. Les structures en rouge localisées au-dessus du trimère représentent une molécule d'IgG1 humaine. Les localisations approximatives des épitopes ciblés par les anticorps neutralisants sont indiquées par des flèches. Les chaînes de carbohydrates sont indiquées en bleu et les clusters d'oligomannose ciblés par l'anticorps monoclonal 2G12 sont indiqués en orange [142].

Immunologie du VIH

Immunologie du VIH

La compréhension de la pathogénèse virale et de son comportement lors de la réponse de l'hôte à l'infection par le VIH-1 est le point-clé pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant le traitement et l'éradication de la pandémie liée au virus du SIDA.

1- La pathogénèse du VIH-1

Le VIH-1 a pu se disséminer dans l'espèce humaine grâce à plusieurs caractéristiques liées à sa pathogénèse. Au cours de la primo-infection, peu de personnes connaissent leur statut virologique car aucun symptôme spécifique n'apparaît et les personnes infectées peuvent ainsi transmettre le virus pendant plusieurs années sans le savoir. Durant cette période, l'équilibre entre l'expansion virale et le système immunitaire est en constante évolution. En effet lors de la primo-infection, le virus va prendre pour cibles les lymphocytes T CD4⁺, les CD8 et les macrophages situés dans les muqueuses ou les tissus lymphoïdes et ces derniers deviennent les principaux sites d'une production accrue de nouvelles particules virales ainsi que de stockage entraînant la destruction des lymphocytes [143-144]. Comme observé dans d'autres infections virales, lors de la primo-infection, le nombre de cellules T CD8⁺ s'élève [168]. Une production accrue de chimiokines et de cytokines proinflammatoires va permettre d'attirer un grand nombre de cellules immunitaires qui seront la cible des nouvelles particules virales produites, expliquant l'infection d'un grand nombre de cellules durant la primo-infection [145-146]. Suite à ce déséquilibre immunitaire, la sécrétion de cytokines antivirales comme les interférons de type I par les cellules T CD4⁺Th1 va induire une réduction de la virémie [147]. L'équilibre entre la production et la destruction de particules virales et de cellules infectées est alors déterminant. La progression de l'infection coïncide avec le déclin de l'activité des CTL. En effet, les CTL sont incapables d'éliminer les virus libres. La réponse humorale va apparaître plusieurs mois après l'infection et va jouer un rôle limité dans la primo-infection [143]. Des anticorps sont alors produits. Parmi ces anticorps, certains sont neutralisants et vont permettre un contrôle des différentes souches virales. Cependant durant cette période de latence, des réservoirs se constituent au sein du cerveau, de l'intestin, des cellules hématopoïétiques ainsi que des cellules T CD4⁺ qui rentreront en quiescence [148]. Ces réservoirs sont inaccessibles à l'effet de la thérapie antirétrovirale. Cependant le système immunitaire continuera sa détérioration ce qui entraîne inexorablement l'avènement d'infections microbiennes opportunistes et une chute drastique du nombre de lymphocytes T CD4⁺ entraînant les personnes infectées vers le stade SIDA.

2- Transmission du VIH

La transmission du VIH a lieu selon différents modes, le contact de particules virales avec une muqueuse intacte ou lésée ou l'introduction des particules dans le sang. La transmission peut aussi avoir lieu durant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement. La transmission sexuelle correspond à 90% des cas de contamination qu'elles soient dans le cadre d'une relation homo ou hétérosexuelle [149-151]. Néanmoins, la transmission par l'exposition des muqueuses aux sécrétions génitales d'origine masculine ou féminine est la cause prédominante d'infection. En effet, les muqueuses sont présentes au niveau de toutes les cavités anatomiques (bouche, organes génitaux et intestin) et servent de point d'entrée pour les particules virales sous forme libre ou au sein de cellules infectées (monocytes-macrophages et lymphocytes T CD4⁺) du sperme par exemple [152]. Chaque muqueuse présente une architecture et des propriétés qui influent sur la possibilité de transmission de l'infection. En effet, l'intégrité de la structure ainsi que l'épaisseur des couches épithéliales d'une muqueuse vont déterminer l'efficacité de pénétration des particules à travers cette barrière. La distribution des cellules cibles au sein de chaque épithélium va déterminer le passage et la transmission du virus aux tissus sous-jacents et aux populations de cellules immunitaires présentes. D'autres paramètres vont se rajouter pour favoriser cette transmission tels que les coinfections, le statut hormonal, les facteurs présents au niveau des sécrétions infectées et l'état de la muqueuse réceptrice [153]. Les muqueuses génitales ne présentent pas de couche kératinisée qui pourrait la rendre infranchissable par un virus. Elles présentent souvent un épithélium pluristratifié pouvant constituer un site de pénétration du VIH puisqu'il abrite des cellules cibles potentielles comme les cellules de Langerhans (CL) [154]. La seconde structure rencontrée est un épithélium monostratifié plus fragile lors de rapports sexuels donc plus sensible au passage des particules virales. Ce passage peut avoir lieu grâce à des mécanismes cellulaires comme la transcytose ou le transport vésiculaire [1; 155]. Les cellules épithéliales de cette région n'expriment ni CD4, ni molécule du CMH de classe II, ni récepteur RfC. En revanche, elles expriment GalCer et peuvent également exprimer CXCR4 ou CCR5. Les DC intra-épithéliales sont préférentiellement localisées au niveau basal ou parabasal et dans la lamina propria. Des lymphocytes intra-épithéliaux T CD4⁺ sont également présents. La contribution relative des différentes structures épithéliales lors de la transmission du VIH-1 est encore mal définie, cependant la pénétration et l'infection par le virus ont été démontrées [156].

En résumé, les muqueuses génitales féminines abritent de nombreuses cellules cibles pour le VIH-1: (1) des lymphocytes et des monocytes CD4⁺ intra-épithéliaux ou sous-muqueux présents dans les muqueuses vaginale et cervicale; (2) une densité très élevée de LC exprimant CD4 ainsi que des facteurs d'attachement pour la gp120. Cependant, la molécule GalCer ainsi que les récepteurs RfC de types II et III sont détectables sur la majorité des cellules épithéliales des muqueuses dans la zone de transition de l'endocervix.

Les épithéliums stratifiés des muqueuses orale, génitale et anale constituent des interfaces entre les milieux externe et interne. Lorsque la muqueuse est intacte, le virus a la capacité de traverser la barrière épithéliale et d'infecter les cellules immunitaires présentes dans les couches internes de l'épithélium. Les virus R5 traversent la barrière épithéliale par transcytose. La sous-muqueuse localisée du

côté basolatéral, contient des cellules du système immunitaire sujettes à l'infection, notamment les cellules de Langerhans, les lymphocytes T CD4⁺ « mémoire » effecteurs et les macrophages [408-409]. Toutes ces cellules infectées empruntent le système lymphatique et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. La Figure 14 illustre la transmission du VIH-1 par voie sexuelle chez la femme. Lorsqu'il y a des micro-ulcérations, le virus atteint plus facilement les cellules du système immunitaire et n'a pas à traverser la barrière de cellules épithéliales. Les conditions responsables de micro-ulcérations dans la muqueuse vaginale, certaines périodes du cycle menstruel, la prise d'hormones (comme la progestérone), et l'inflammation (en présence d'infections sexuelles) sont des facteurs favorisants.

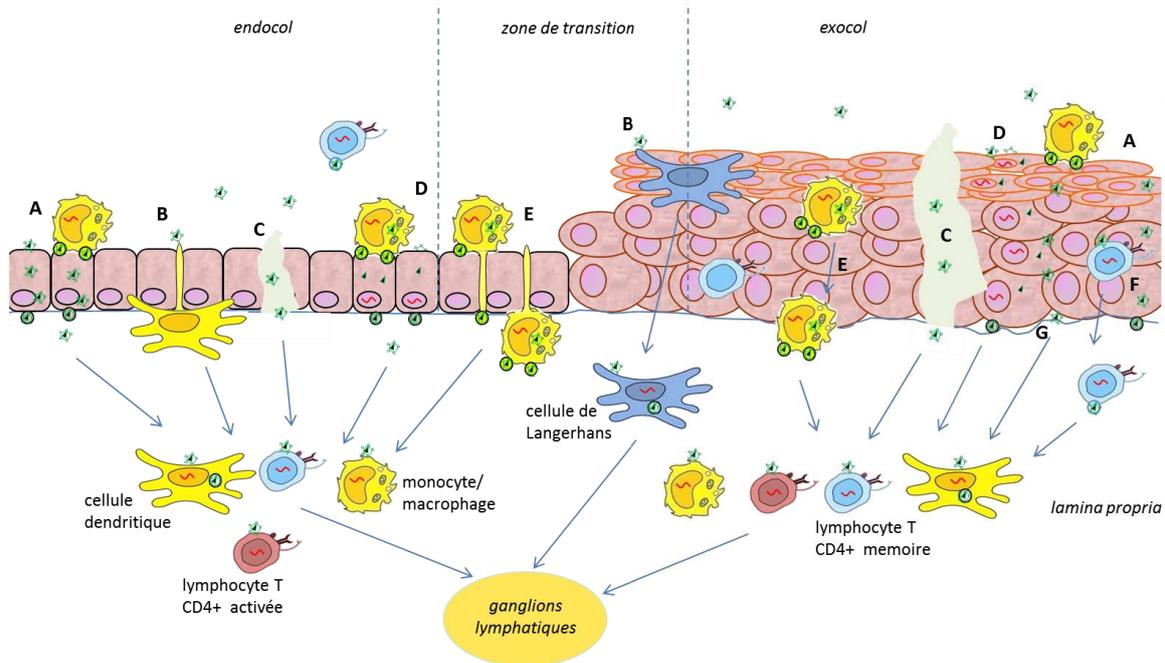


Figure 14 : Les différentes hypothèses de franchissement des épithéliums génitaux par le VIH-1 [156]; A) Passage par transcytose B) Prise en charge par les DC/LC C) Passage par brèche D) Transmission via des cellules épithéliales, avec ou sans infection E) Transmigration des leucocytes séminaux F) Infection des leucocytes intraépithéliaux [155]

3- L'immunité anti-VIH

3.1 L'immunité innée

L'immunité innée est le premier moyen de défense de l'organisme contre l'infection. Cette réponse est immédiate et non spécifique. Cependant, son rôle est primordial car elle permet de limiter l'infection primaire au sein des muqueuses pour donner lieu à une réponse adéquate plus spécifique en orchestrant l'immunité acquise ou adaptative. En effet, les acteurs de cette réponse sont cellulaires par les phagocytes (macrophages, cellules de Langerhans ou les neutrophiles) et les Natural Killer (NK et NKT). L'action de ces cellules se traduit par la production de molécules qui modulent la réplication du VIH comme les cytokines, les interférons de type I et II et les chémokines ou la destruction des virions et des cellules infectées.

Lors d'une infection par le VIH, l'homéostasie du système immunitaire est altérée puisque l'infection des macrophages réduit leur fonction phagocytaire. La diminution de cette fonction vis-à-vis des agents pathogènes favorise l'émergence de maladies opportunistes notamment la pneumocystose dans les formes évoluées [157-159]. Cette altération va induire une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ [160-161]. Durant l'infection par le VIH, d'autres populations cellulaires vont être atteintes comme les cellules dendritiques. En effet les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont responsables de la production de l'interféron antiviral de type I et induisent une réponse de type Th1. Les cellules dendritiques myéloïdes secrètent l'IL2 qui joue un rôle clé dans la réponse Th1 et cytotoxique. Chez les patients VIH⁺, le nombre de cellules dendritiques va diminuer dès le début de l'infection et la sécrétion de l'IL2 [162-163] et l'un des objectifs des thérapies mises en place lors d'une infection par le VIH est la restauration de l'immunité antivirale. Le dérèglement des cellules dendritiques va aussi avoir une incidence sur les cellules NK et NKT. En effet, les NK interagissent avec les cellules dendritiques infectées et peuvent les détruire par induction de l'apoptose. Or, chez les patients qui présentent une charge virale élevée, la capacité des NK à tuer les cellules dendritiques infectées par le VIH est faible. Cette diminution de la cytotoxicité des NK est liée au Tat du VIH qui va inhiber leur action [164].

D'autres facteurs sont associés à l'immunité antivirale non spécifique comme les protéines TRIM 5α et APOBEC 3G (Apolipoprotein B Mna-Editing Enzyme-Catalytic Polypeptide-Like-3G) [165-166]. La protéine TRIM 5α, est une protéine du cytosquelette qui confère une résistance à l'infection par le VIH dans des espèces de singes comme *Macaca mulatta* et *Cercopithecus aethiops*. TRIM 5α agit en fixant les protéines de capsid du VIH et induit leur ubiquitination afin qu'elles soient détruites. Trim 5α est produite chez l'homme mais semble ne pas inhiber la multiplication des virus au sein des cellules infectées [167]. L'APOBEC 3G modifie l'ADN complémentaire viral en désaminant ses cytidines ce qui va entraîner sa dégradation ou sa mutation, désactivant les gènes viraux. Le Vif viral interagit avec l'APOBEC 3G en se fixant et en induisant son ubiquitination et donc sa dégradation. Vif agit aussi en se liant au site nécessaire à l'activité désaminase. Plusieurs études ont démontré que les souches virales déficientes en Vif sont affectées par l'APOBEC 3G, alors que celles qui l'expriment sont résistantes [168].

3.2 . L'immunité innée des muqueuses

Le système immunitaire des muqueuses représente la première barrière contre l'intrusion des agents pathogènes. Ce système protège la surface des muqueuses d'abord par des mécanismes physico-chimiques comme le pH des sucs gastriques ou de la muqueuse vaginale [169] ou les enzymes des sécrétions comme les larmes ou le glycocalix, constitués de mucus, d'enzymes (telles que le lysozyme, la lactoferrine, et la lactoperoxydase) ainsi que de défensines. Ces facteurs vont permettre de capturer les agents pathogènes (ex du mucus) et d'inhiber significativement leur développement à la surface des muqueuses.

Cependant, cette première ligne de défense est souvent contournée et les agents pathogènes se retrouvent au contact des tissus lymphoïdes associés aux

muqueuses (MALT) entraînant ainsi la mise en route de réponses immunitaires spécifiques, aboutissant à la neutralisation des agents infectieux et à la tolérance des micro-organismes non pathogènes. Le MALT a trois fonctions majeures: (1) la protection des muqueuses contre le développement et la colonisation par des micro-organismes pathogènes (2) la prévention de l'internalisation des bactéries commensales ou des antigènes sous forme de protéines non dégradées dérivées de la nourriture et de l'environnement, et (3) l'induction de la tolérance vis-à-vis de substances inoffensives comme les bactéries commensales de la flore intestinale ou vaginale. Ces fonctions sont plus ou moins importantes selon la localisation anatomique du MALT. En effet, le MALT présente des caractéristiques différentes selon les tissus où il se trouve: les bronches (BALT : *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*), l'intestin (GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) et la muqueuse nasale (NALT: *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*). Le MALT est le principal site inducteur des réponses immunitaires dans l'organisme. La lamina propria joue un rôle important d'expansion et de différenciation des cellules B. Le MALT est le plus grand tissu lymphoïde de l'organisme et héberge environ 80% des cellules immunitaires chez l'Homme [170-171]. Le GALT est le composant majeur du MALT puisqu'il contient plus de 40 % des lymphocytes de l'organisme, ce qui en fait une des cibles majeures du VIH-1.

Le système immunitaire muqueux peut être divisé en deux catégories de sites, les sites inducteurs et les sites effecteurs. Les antigènes sont fixés à la surface des muqueuses. Les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, vont prendre en charge les immunogènes ainsi que les cellules M pour activer les lymphocytes T et B naifs présents. Selon le site muqueux, les épithéliums ont une organisation cellulaire différente et une stratégie de capture de l'antigène particulière. Au niveau des muqueuses orale et urétrale, l'épithélium est pluristratifié alors que la muqueuse intestinale est une monocouche. L'épithélium à la surface des voies respiratoires et au niveau vaginal varie entre une organisation pseudo-stratifiée et monocellulaire. Ces épithéliums ne sont pas des obstacles infranchissables, mais sont plutôt des assemblages de cellules qui contrôlent les échanges entre la lumière et la lamina propria. Dans l'épithélium stratifié et pseudo-stratifié, l'antigène est pris en charge par les cellules dendritiques qui jouent le rôle de sentinelles mobiles au sein de l'épithélium, elles vont fixer des antigènes dans le lumen puis migrent vers les tissus lymphoïdes locaux ou éloignés. Au niveau des épithéliums intestinaux et des voies respiratoires dont les espaces intercellulaires possèdent des jonctions serrées, des cellules épithéliales spécialisées comme les cellules M fixent les pathogènes et les transfèrent par différents types de transport transépithélial (transcytose, endocytose) de la lumière vers les tissus lymphoïdes organisés [172]. Les cellules épithéliales n'expriment pas de CD4 mais plutôt le CXCR4 ou le CCR5 ainsi que des molécules capables de capturer le VIH-1 comme les galactosylcéramides [69] et les héparane-sulfates. La capture et l'internalisation des particules virales ou des cellules infectées va permettre au système immunitaire adaptatif de se mettre en place et l'entrée en action des lymphocytes T (LT) pour obtenir une réponse cellulaire ou les lymphocytes B (LB) et les plasmocytes pour obtenir une réponse humorale. Les populations lymphocytaires pouvant être classées en 2 groupes, un présent dans l'épithélium (lymphocytes intraépithéliaux, essentiellement LT CD8⁺ et LT $\gamma\delta$) et un

au sein de la lamina propria (LT CD4⁺ helper, LT CD8⁺, NK et LB). Les défenses contre l'infection par le VIH-1 au niveau des muqueuses sont de types cellulaire et humorale [173]. L'immunité innée n'est pas toujours suffisante pour supprimer totalement un agent infectieux, mais elle est indispensable pour une première défense en attendant que l'immunité adaptative se mette en place (de 4 à 5 jours).

3.3 . L'immunité adaptative ou acquise des muqueuses

La réponse immunitaire adaptative est induite dès les premiers jours de l'infection et la mise en place de l'immunité innée. Elle agit en synergie avec la réponse immune innée pour répondre de manière adéquate et en réaction aux informations issues de cette dernière. Dans cette l'immunité acquise, les lymphocytes T CD4⁺ vont être les acteurs majeurs de l'orientation des réponses. Leur destruction lors de l'infection par le VIH donne lieu à une dérégulation complète de tout le système immunitaire. L'immunité acquise va se traduire par l'activation, au niveau des sites effecteurs du MALT, des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 ou Th2 suite à la reconnaissance des antigènes qui sont présentés par les CPA. Cette réponse est de type cellulaire via les cellules T CD8⁺ et la voie des Th1 ou humoral via la production d'anticorps produits par les lymphocytes B activés par les lymphocytes T CD4⁺ de type Th2. Les anticorps vont agir selon 3 façons suite à leur liaison au virus, 1) ils induisent sa lyse par le complément, 2) ils amorcent sa capture et sa dégradation par les phagocytes et 3) ils inactivent le virus en bloquant son attachement sur les cellules cibles. Au niveau des muqueuses, les IgA représentent la majorité des anticorps sécrétés tandis qu'au niveau systémique, les IgG représentent l'isotype principal [173]. Les plasmocytes sécrétant les IgA se trouvent principalement dans la lamina propria. A ce niveau, les IgA peuvent être transportées à travers l'épithélium vers la surface extérieure et sont sécrétées sous forme dimérique, une fois associées à la chaîne J. Cette forme de polymère d'IgA peut être fixée à la surface basolatérale grâce au récepteur poly-Ig (pIgR) et sécrétée par endocytose vers la lumière, où elle peut se lier à l'antigène pour former des complexes immuns. Une fois libérée, l'IgA sécrétoire reste liée à une partie du pIgR par sa région Fc lui conférant une protection vis à vis des dégradations par des protéases présentes au niveau des muqueuses [174]. Les récepteurs Fc néonataux (FcRn) jouent aussi un rôle dans l'immunité des muqueuses lors de la transmission passive d'IgG de la mère au fœtus *via* le placenta. Chez les adultes, des antigènes fusionnés avec un fragment Fc d'IgG peuvent être délivrés au niveau des muqueuses [174]. Au niveau systémique, ce sont les anticorps de type IgG qui sont majoritairement produits. Tout au long de l'infection, ces anticorps vont reconnaître plusieurs épitopes issus des protéines Gag, Nef, Rev et Env du VIH. Cependant le virus va continuer à muter et va développer des stratégies d'échappement suite à la pression immunitaire, laissant apparaître des souches résistantes, notamment grâce à la glycosylation de l'enveloppe.

En parallèle de la réponse humorale, une réponse cellulaire va se mettre en place grâce aux cellules T CD8⁺ qui vont détruire les cellules infectées. Les lymphocytes T CD8⁺ forment une population hétérogène de cellules naïves, de cellules dites mémoire et de cellules effectrices (CTL). Les CTL sont des T CD8⁺ activées par les T CD4⁺ de type Th1. Les CTL identifient les cellules infectées pour les détruire. Cette reconnaissance entraîne la mort de la cellule cible par l'intermédiaire d'une

interaction directe entre la molécule Fas (CD95) et le Fas ligand, et par la dégranulation des CTL libérant la perforine et les granzymes au contact de la cible. Les LT CD8⁺ vont sécréter de l'interféron gamma (INF γ), une cytokine inhibant localement la réplication virale et des facteurs solubles réduisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules (chimiokines Rantes, MIP-1 α et MIP-1 β) [175].

4- La réponse humorale dirigée contre la glycoprotéine d'enveloppe du VIH

Les patients VIH⁺ développent de fortes réponses anticorps dirigées contre la glycoprotéine de l'enveloppe virale. Toutefois, ces anticorps sont généralement spécifiques de la souche mais non neutralisants ce qui ne permet pas d'obtenir une réponse immunitaire protectrice ou préventive [176-177]. La plupart des anticorps monoclonaux (AcM) produits sont dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe et semblent provenir de l'idiotype dominant 1F7 (IgM) [178]. Il semble que les anticorps neutralisants nécessitent un niveau élevé d'hypermutation somatique et de polyréactivité. Toutefois, on ignore si cet idiotype est nécessaire pour avoir des propriétés neutralisantes à très large spectre. On ignore également si les anticorps neutralisants à très large spectre n'appartenant pas à l'idiotype 1F7 peuvent être induits par la vaccination [179]. La variabilité génétique due à la transcriptase inverse (sujette à des erreurs) ainsi que la pression immunitaire de l'hôte donnent lieu à l'évolution du VIH-1 en plusieurs sous-types ou clades avec des formes recombinantes. Un des obstacles fondamentaux au développement de vaccins contre le VIH-1 repose sur la capacité du virus à traverser les surfaces muqueuses pour cibler les cellules T CD4⁺ préférentiellement, et d'établir rapidement un réservoir de cellules infectées quiescentes. Les propriétés des virus transmis au niveau muqueux indiquent que dans 70 à 80 % des cas, un seul virus ou une cellule infectée par le virus entraînent une infection clinique efficace [180]. Ces virus sont généralement de tropisme R5 et masquent les trimères fonctionnels des glycoprotéines d'enveloppe nécessaires pour le déclenchement d'une réponse anticorps efficace et subissent des mutations rapides qui induisent des infections [181-182]. Ces propriétés virales réduisent l'efficacité des réponses immunitaires innée et adaptative qui peuvent protéger efficacement contre l'entrée du VIH et une infection productive. En raison de cette diversité (jusqu'à 35% pour la gp120), il s'avère impossible de concevoir un candidat vaccin unique qui puisse induire une immunité suffisamment efficace pour reconnaître les déterminants antigéniques clés des souches virales circulant à travers le monde. Bien que les mécanismes de l'immunité innée contribuent à contrôler l'infection par le VIH, il paraît peu probable que ces réponses vaccinales renforceront la protection contre le VIH. [183-184]

4.1. L'immunogénicité de la gp120

Durant l'infection par le VIH, les anticorps spécifiques de la gp120 sont habituellement dirigés contre les sites conservés de l'enveloppe. Ces sites sont cruciaux pour la reconnaissance des cellules cibles ou la fusion virale [185]. Les études de la structure en 3D de l'enveloppe ont montré que ces régions sont très flexibles durant l'interaction avec d'autres molécules de surface ce qui explique pourquoi les anticorps spécifiques de certaines régions variables ont une activité

neutralisante. Cependant, l'induction d'anticorps neutralisants après immunisation n'a jusqu'à présent pas abouti [185-191]. En effet, les anticorps spécifiques de la gp120 reconnaissent généralement des épitopes localisés sur les boucles variables [192-193] ou les épitopes conservés dominants de l'enveloppe [194-195]. Ceci permet d'avoir une base pour la compréhension de la réactivité de plusieurs AcM ciblant les boucles variables V1/V2 et V3 de la gp120 et les épitopes quaternaires (QNEs) formés par V2 et V3 (cf. Figure 15). La boucle V3 et le « bridging-sheet » abritent le site de liaison du co-récepteur viral (CCR5 ou CXCR4) [196-199]. La face extérieure de la gp120 riche en glycanes est également la cible de l'anticorps monoclonal neutralisant à large spectre AcMNL 2G12 [200-203] (cf. Figure 15 et Tableau1). En effet, le 2G12 ainsi que le b12 sont les premiers AcMNL actifs dirigés contre la gp120 à avoir été décrits (cf. Tableau1). Le 2G12 présente un dimère de domaine VH inhabituellement verrouillé générant un site de liaison monovalent étendu. Cette zone de liaison reconnaît les groupements d'acides aminés clustérisés liés aux mannoses $\alpha 1 \rightarrow 2$ présents sur la partie distale des oligomannoses localisés dans le domaine externe de la gp120. Le 2G12 fait intervenir un mécanisme réversible unique de la neutralisation et inhibe l'interaction entre la boucle V3 et la tyrosine sulfate présente dans l'extrémité NH2-terminale du CCR5. Cette liaison perturbe l'entrée du virus et la formation de complexes de fusion [204]. La capacité des 2G12 monomériques ou dimériques à médier l'ADCC ou à activer le système du complément a été clairement démontré *in vitro* [205-206]. Le b12 est dérivé d'une banque de phages où les chaînes légères et lourdes ont été aléatoirement assemblées. Le b12 reconnaît un épitope qui chevauche le site de liaison de la gp120 au récepteur CD4 et neutralise efficacement plusieurs souches du VIH-1. Le b12 peut aussi protéger les macaques après administration vaginale de SVIH [207-208].

De nombreux anticorps ayant la capacité de lier le site CD4-induit ont été décrits et, parmi eux, les AcN 17b, X5, m18, et m14. La totalité de ces anticorps présente une longue région H3s qui joue un rôle majeur dans leurs mécanismes de liaison. Les régions H3s de X5, m6 et m9 semblent être très flexibles et très puissantes pour neutraliser le VIH [64, 209-211]. Les récents travaux de Corti et al ont décrit de nouveaux anticorps puissants et des AcNL HGN194 et HJ16, dirigés contre la gp120 [212] (cf Tableau1). HJ16 a été obtenu à partir de donneurs infectés par un virus de clade C. Cet anticorps se lie au CD4bs, empêchant ainsi l'interaction du VIH-1 avec le CD4. HJ16 reconnaît un épitope discontinu sur une surface proche du CD4bs de la gp120. Cet épitope est complètement distinct et ne chevauche pas celui reconnu par l'anticorps b12. HJ16 a une forte activité neutralisante comparable à celle du b12. HJ16 et b12 présentent une complémentarité de leurs propriétés neutralisantes vis-à-vis d'un groupe de virus avec une efficacité limitée sur les isolats de Tier 2 [212-213]. HGN194 a été isolé des cellules B mémoire d'un individu Long Term-Progressor infecté par une forme circulante recombinante (CRF) de VIH-1 de clade AG. Cet anticorps reconnaît un épitope conformationnel dans la boucle V3 et neutralise les Tier-1 (virus avec une faible sensibilité à la neutralisation médiée par les anticorps) en fonction des clades (neutralisation de seulement 11% des virus Tier-2 testés) [214]. *In vivo*, l'administration des IgG1 HGN194 chez des singes rhésus diminue de

manière significative le titre des virus après une immunisation par VIH et semble affecter beaucoup les réservoirs viraux [214] (cf Tableau1).

L'utilisation de nouvelles stratégies en plusieurs étapes a permis la découverte de nombreux AcN contre la gp120 [215]. Cette nouvelle approche de screening des AcN issus d'un patient infecté par un VIH-1 de clade A, combine la fixation des anticorps à une gp120 et à une gp41 recombinantes lors d'un test de micro-neutralisation à haut rendement qui améliore la qualité des AcN sélectionnés. Les cellules B provenant des donneurs infectés obtenues lors de cette sélection ont été isolées [215]. Les pools de clones de la région VH ou VL ont été sous-clonés avec un domaine constant d'IgG1. Les premiers AcMNL décrits sont le PG9 et le PG16 (cf. Figure 15). Ils sont somatiquement liés et semblent provenir des mêmes recombinaisons de chaînes légères et lourdes. Ces anticorps ont été identifiés à partir d'un large screening de 1800 sérums de patients VIH⁺. PG9 et PG16 ciblent des épitopes discontinus, impliquant les régions conservées des boucles V1, V2 et V3 et recouvrant le CD4bs, présents sur les spicules viraux rassemblés. Ils sont sensibles à la perte du glycane N332 et à la substitution de N160/K168 dans la boucle V2 ou à une isoleucine en position 215 dans la région C2 [216], mais se distinguent clairement du 2G2 [14, 215]. Malgré la diversité reconnue de la gp120 de l'enveloppe du VIH-1 et la grande variabilité des régions V2 et V3 [215], les tests de neutralisation indiquent que l'épitope reconnu est conservé dans 70 à 80% des isolats viraux circulants. Récemment, Mc Lellan *et al* [217] a déterminé la structure atomique du PG9 en le complexant avec V1/V2, ce qui a permis l'identification des motifs conservés qui permettent la reconnaissance de la gp120 [217]. PG9 compense la variabilité de la séquence de V1/V2 en se liant au squelette de la protéine plutôt qu'aux acides aminés variables des chaînes latérales. Associé à la forte conservation du glycane N332 de la gp120, PG9 est capable de reconnaître 80% des souches circulantes du VIH-1. L'interaction entre PG9 et V1/V2 se fait principalement avec le N-glycane en position 160 dans la gp120. La chaîne lourde « Complementarity Determining Region » (CDR H3) se lie par le bouclier glycané à la zone proximale N-acétyl-glucosamine de la gp120. En plus de la reconnaissance des glycanes, un feuillet de la CDR H3 se fixe par liaison hydrogène au feuillet C du V1/V2. Le feuillet C est le plus variable de V1/V2, et cette liaison indépendante de la séquence signifie qu'elle permet probablement une augmentation de la reconnaissance [217]. La charge nette dans le feuillet β C influence l'interaction avec le PG9 et le PG16. La longueur et le nombre de sites de glycosylation sur V2 confèrent une résistance au PG9 et au PG16 en créant des encombrements ou en masquant les résidus cruciaux pour la liaison des anticorps PG9 ou PG16 [218]. Le CDRH3 du PG9 contient une structure en tête de marteau capable de s'insérer entre les deux glycanes de la gp120 (cf. Figure 15), se mettant en contact avec les glycanes qui les entourent et avec la surface protéique à sa base [219]. La microscopie cryo-électronique de la liaison de PG9 avec le glycane 160 (Man5GlcNAc2) suggère que ce glycane serait d'une taille adéquate pour permettre une liaison avec la chaîne légère du PG9 sans étirement entre le sommet et la base du CDRH3 de cet anticorps [217]. Par conséquent, PG9 est un exemple au niveau du système immunitaire, utilisant la défense élaborée par les virus grâce aux

glycanes en s'y rattachant directement. Les changements des chaînes légères et lourdes qui permettent la reconnaissance des glycanes se produisent durant la maturation de l'affinité, expliquent l'augmentation de l'ampleur et de l'affinité de PG9 (et PG16). La sensibilité globale des virus à la neutralisation est la conséquence des caractéristiques moléculaires de la boucle V2 et la neutralisation par PG9/16 s'équilibre par les glycanes, la charge positive nette et éventuellement la longueur de la boucle V2. La neutralisation par le PG9 est fortement corrélée à celle par PG16, indiquant que ces anticorps reconnaissent un épitope commun du VIH-1. Ceci suggère qu'une surface commune des paratopes du PG9 et PG16 pourrait être impliquée dans la reconnaissance du VIH-1. Des différences importantes dans les séquences de PG9 et PG16 ont été trouvées [14, 220]. L'analyse des gènes variables des anticorps révèle deux paires de variantes somatiques, chacune contient une longue CDRH3. La boucle CDRH3 est associée à la polyréactivité des anticorps monoclonaux 2F5, 4E10 et b12, qui se lient également à différents autoantigènes comme les phospholipides (cardiolipine, phosphatidylsérine) ou les histones [221-222] (cf Tableau 1).

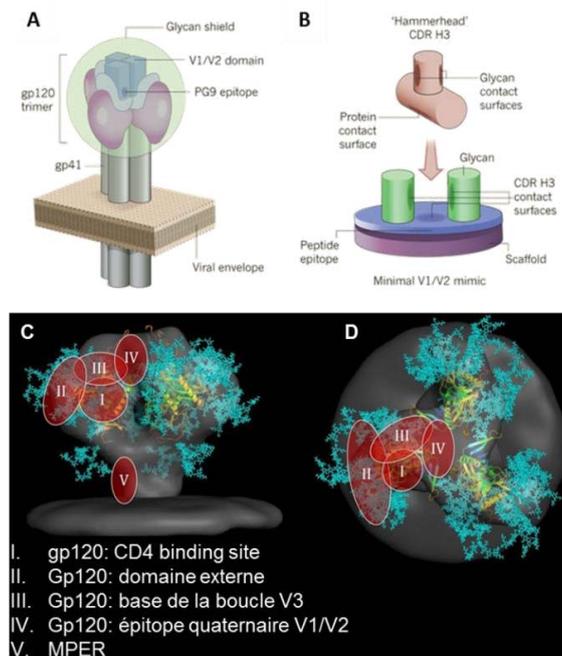


Figure 15: Représentation de la structure atomique de la glycoprotéine d'enveloppe gp160 sous sa forme trimérique et les zones d'interaction avec les anticorps neutralisants. A,B) Représentation de l'interaction du CDRH3 du PG9 avec les glycanes de la gp120. A) Représentation de la gp160 ancrée dans la membrane virale. Le bouclier de glycanes forme une protection immunitaire contre les anticorps neutralisants dirigés contre les épitopes sous-jacents, l'épithope du PG9 étant le squelette atomique des glycanes conservés N160. B) Représentation de l'interaction du CDRH3 du PG9 avec les glycanes présents sur les boucles V1/V2. C,D) Représentation de la structure atomique par microscopie électronique des principales zones de contact des anticorps monoclonaux sur la gp160 trimérique glycosylée. C) Vue de côté des 5 zones épitopiques reconnues selon le cluster des AcMNL. Les glycanes sont représentés en cyan D) Vue de dessus de ces 5 zones. I : site de liaison au CD4 de la gp120, II : la face externe glycosylée de la gp120, III : la base de la boucle V3, IV : l'épithope quaternaire formé par les boucles V1/V2 de la gp120. V est l'épithope neutralisant principal du MPER de la gp41 [219, 223].

D'autres études récentes ont décrit un certain nombre d'anticorps avec un effet et une ampleur de neutralisation différents. Une nouvelle famille d'anticorps neutralisants a été isolée grâce au screening des anticorps contenus dans le surnageant des cellules B mémoire de 4 patients sur plus de 1800 donneurs VIH⁺. Les patients retenus sont ceux dont les surnageants ont montré des profils de neutralisation très supérieurs. La purification des anticorps a été basée sur le score de deux éléments, la capacité et l'ampleur des profils de neutralisation. Les gènes variables des anticorps ont été isolés des clones de cellules B présentant une activité neutralisante à large spectre et exprimant des IgG complètes. Les anticorps purifiés à partir de chaque patient appartiennent tous au même cluster clonal d'anticorps. Deux des 6 AcMNL (PGTs 125-128, 130-131) qui lient spécifiquement le glycanes Man8/9 de la gp120 décrits récemment sont fortement neutralisants sur plusieurs clades [11, 224] (cf Tableau1). Un modèle du complexe Fab PGT128 avec un domaine externe de la gp120 complètement glycosylé révèle que les anticorps pénètrent dans le bouclier glycanes et reconnaissent deux glycanes conservés N332 et N301, ainsi que les segments courts du feuillet β de la boucle V3 de la gp120. Il a également été observé que leur neutralisation peut être due à la liaison à d'autres trimères de la surface virale. Le PGT128 est l'anticorps ayant l'activité la plus large de ces anticorps, il neutralise plus de 70% des virus circulants et est en moyenne plus puissant que les AcMNL récemment décrits PG9, PG16, VRC01 et VRCPG04 et de deux logs plus puissant que les AcMNL prototypes décrits précédemment [189, 196, 215, 225]. Les anticorps PGT neutralisent les trimères à la surface cellulaire avec plus d'effet que leur Fab et présentent également des propriétés intéressantes en étant capables de réduire la demi-vie du virus, alors que le 2G2 n'a aucun effet sur celle-ci. Par microscopie électronique, il a été démontré que PGT127 et 128 sont capables de relier les spicules à la surface des particules virales, ce qui augmente leur affinité par l'avidité, mais pas sur la surface des cellules [224]. Ces anticorps ciblent les épitopes bien conservés et hautement exposés incluant deux glycanes (N301/N332), ainsi que les composants du squelette de la boucle V3, ce qui fait de cette région un immunogène intéressant pour la conception du vaccin [11]. Dans la même famille d'anticorps neutralisants à large spectre, PGT 141-145 présente une forte affinité pour les épitopes quaternaires similaires à ceux décrits pour PG9 et PG16. Ces anticorps neutralisent 40-80% des isolats de VIH-1 et présentent les mêmes propriétés de CDRH3 que PG9 ou PG16 avec une boucle CDRH3 étendue et une boucle β capable de pénétrer dans la barrière de N- glycanes et d'atteindre la protéine sous-jacente.

L'impossibilité d'isoler des AcMNL dirigés contre les CD4bs à partir de cellules B humaines est probablement due à l'utilisation d'immunogènes qui réagissent avec plusieurs anticorps dirigés contre VIH-1, en incluant les anticorps non neutralisants. En combinant les observations récentes, obtenues par une construction assistée par ordinateur de la structure de l'enveloppe, des formes recombinantes de l'enveloppe du VIH-1 qui interagissent avec les anticorps neutralisants dirigés contre le site de liaison du CD4 ont pu être définies [178, 189, 226-227]. L'utilisation d'un noyau stabilisé (RSC) de la molécule gp120 du VIH-1, mimant le site initial de liaison au récepteur CD4, a permis la purification d'AcM VRC spécifiques du CD4bs avec un large spectre de neutralisation. Pour isoler ces AcM, un tri des cellules B mémoire

spécifiques a été utilisé. Par PCR, les gènes des chaînes H et L des IgG ont été amplifiés [228]. Les cellules B mémoire capables de se lier au RSC ont été sélectionnées. Les gènes des chaînes L et H ont été clonés dans les vecteurs d'expression des IgG1 qui reconstituent la région constante permettant l'expression de l'IgG entière. Trois anticorps (VRC01, VRC02 et VRC03) ont été isolés grâce à cette stratégie. La comparaison de la séquence des nucléotides des chaînes légères et lourdes révèle que le VRC01 et VRC02 sont des variantes somatiques du même clone IgG1. La région CDRH3 des deux anticorps est composée des mêmes 14 acides aminés, tandis que la région CDR3 du VRC03 comporte 16 acides aminés. Les deux anticorps monoclonaux présentent de très forts taux de mutation somatique, avec 32% des gènes variables des chaînes lourdes (VH) et 17 à 19% des gènes variables des chaînes légères kappa (VK) qui divergent des séquences des gènes de leur lignée germinale présumée. VRC03 a potentiellement dérivé d'un clone IgG1 différent, mais sa chaîne lourde a dérivé d'un même allèle comme VRC01 et VRC02. VRC03 présente aussi des mutations hypersomatiques avec une insertion inhabituelle d'un acide aminé dans la structure de sa chaîne lourde, 3 à 30% de VH et 20% des nucléotides de VK dérivent des séquences du gène de la lignée germinale supposée. Globalement, les 3 anticorps partagent un motif commun au niveau des chaînes lourdes CDR1, CDR2 et CDR3. L'analyse par microscopie cryo-électronique des caractéristiques de la liaison révèle que VRC01 et VRC02 agissent comme des agonistes partiels du CD4 dans leur liaison avec la gp120 et imitent partiellement l'interaction du CD4 avec la gp120 [229]. Cette caractéristique peut expliquer leur ampleur, puisque l'interaction avec CD4 est cruciale dans l'infection. Dans ces études, il a été observé que parmi les isolats VIH-1 testés pour leur sensibilité au VRC01, 173/190 sont neutralisés et seulement 17/190 sont résistants. Les résultats pour VRC02 sont très similaires. VRC03 est moins efficace que VRC01 et VRC02, en neutralisant seulement 57% des virus [189]. Une analyse structurale de ces isolats résistants montre des variations importantes dans la région V5 (cf. Tableau 1). Toutefois, la faible fréquence de la résistance au VRC01 suggère qu'il utilise un mécanisme de reconnaissance qui permet une liaison malgré les variations du V5. L'étude de l'interaction de VRC01 avec V5 montre que la reconnaissance du VRC01 au niveau du domaine V5 de la gp120 est différente de celle observée avec le CD4. La boucle V5 s'insère dans l'espace entre les chaînes lourdes et légères. Le modèle des interactions entre VRC01 et le trimère fonctionnel de l'enveloppe a été récemment proposé. Dans ce modèle, VRC01 fige le trimère dans une conformation à faible énergie et désactive d'autres remaniements qui se produisent durant l'entrée du virus [227]. Par conséquent, l'interaction avec les résidus les plus conservés à la base de la boucle de base est suffisante pour l'activité de VRC01, indépendamment des variations dans la partie supérieure de la boucle V5 [178]. Enfin, le fait que le VRC01 ne présente pas de propriétés auto-réactives ou polyréactives peut faciliter l'exploitation des études de protection passive chez les primates non-humains et chez les humains.

Récemment, le séquençage en profondeur, combiné avec l'étude en bio-informatique, a été utilisé pour la première fois dans l'identification des séquences AcMNL à partir d'un million de séquences variables de chaînes lourdes chez les

individus infectés par le VIH. Ce séquençage en profondeur a permis d'isoler plusieurs anticorps, appelés anticorps VRC et VRC-like, y compris les AcMNL VRCPG04 isolés à partir d'un donneur infecté par un virus de clade A1/D et le VRC-CH31 d'un autre donneur. Ces anticorps sont similaires au VRC01 dans leur puissance et leur efficacité. Ils se lient également aux CD4bs, sont matures avec une affinité élevée, et dérivent du gène de la souche germinale IgVH1-2. PGV04 a été purifié à partir des cellules B mémoire d'un « élite neutraliseur », en utilisant la protéine RSC3 et à partir d'une version sans le CD4bs pour une purification sélective des anticorps CD4bs puissants. VRC-PG04 a un profil de neutralisation différent de CD4, b12 et VRC01. Durant les premiers tests de neutralisation contre un panel de 162 pseudovirus multiclades, PGV04 a neutralisé 88% des pseudovirus, alors que PG9 en neutralise seulement 75% [230]. Par conséquent, VRC-PG04 présente une affinité plus forte que PG9 avec une efficacité similaire. Dans le second test de neutralisation avec un panel de 97 pseudovirus, PG9, PGV04 et VRC01 neutralisent 82%, 87% et 93% des virus, respectivement. Par conséquent, VRC01 et PGV04 ont approximativement la même affinité et le même profil de neutralisation. En plus, VRC-PG04 ne montre pas de polyréactivité [230]. Plusieurs substitutions d'alanine diminuent la neutralisation et la liaison des anticorps monoclonaux au CD4bs. La substitution du D279 réduit la neutralisation par VRC01 et CD4-IgG mais n'affecte pas la neutralisation par b12 alors que la substitution d'I420A et I423A réduit la neutralisation par VRC01 mais augmente le pouvoir neutralisant de CD4-IgG et de b12. Tandis que chacune de ces trois substitutions (D279A, I420A, and I423A) bloque la neutralisation par PGV04. En outre, certaines substitutions au niveau de la boucle V3 diminuent la neutralisation par PGV04 et VRC01 alors qu'elles augmentent la neutralisation par CD4-IgG et b12. La nature hautement conservée des acides aminés est importante pour la reconnaissance par VRC-PG04 et explique certainement le large spectre de neutralisation de PGV04. Contrairement à VRC01, VRC-PG04 n'a pas amélioré la liaison de 17b ou X5 à leur épitope (le CD4 induit, CD4i site) dans la région du co-récepteur du monomère gp120 [230]. VRC-PG04 présente une fréquence de mutations du gène de la chaîne lourde variable (VH) et un niveau de maturation de l'affinité semblables à celles observées pour VRC01-03. Le complexe du Fab de VRC-PG04 a été cristallisé dans la gp120 du clade A/E 93TH057 recombinant qui a été précédemment cristallisé avec VRC01 [178]. Le complexe cristallisé montre une forte similarité avec VRC01, malgré les différentes origines des donneurs et seulement 50% d'acides aminés identiques dans la région variable HC

Une superposition des chaînes lourdes de PGV04 et VRC01 révèle de petites différences pour l'interaction des ponts salins entre l'Asp³⁶⁸ de la gp120 et l'Arg⁷¹ du VRC01 qui ont été retrouvés pour VRC-PG04. Cette remarquable convergence observée dans la reconnaissance avec VRC01, VRC03 et VRC-PG04 suggère un mécanisme similaire de la reconnaissance de la gp120 du VIH-1, conservé chez les patients infectés. La précision requise pour ce mode de reconnaissance apparaît certainement à la suite des multiples mécanismes d'évasion immunitaire qui protègent le site d'attachement de CD4 à la gp120 du VIH1 [231]. Ainsi, des liaisons

H précises sont nécessaires dans la structure des régions avec des interactions hydrophobes et augmentent les liaisons du site initial avec le CD4 [141, 178, 225].

Cette convergence dans la reconnaissance des épitopes ne tient pas à l'identité des séquences des anticorps. En effet, les 10 anticorps qui lient le RSC3 utilisent une souche germinale IGHV1-2*02 et accumulent 70 à 90 changements de nucléotides. Même si ces anticorps permettent la reconnaissance des mêmes épitopes, seulement deux résidus provenant de l'allèle mature de la cellule germinale IGHV1-2*02 tiennent à deux acides aminés [225]. Ces changements se produisent lors du contact hydrophobe de la région critique CDR H2. Malgré cette différence de maturation, la comparaison des paratopes de VRC01, VRC03 et VRC-PG04 montre que plusieurs de ces changements sont de nature chimique. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que la maturation de l'affinité augmente avec la reconnaissance de l'épitope même s'il y a une différence dans la maturation des résidus, VRC-PG04, VRC01, b12 et CD4-IgG reconnaissent quand même le CD4bs.

La purification des cellules B mémoire du sang des individus infectés par le VIH en utilisant des régions de la protéine d'enveloppe de VIH a été récemment décrite [228, 232]. Les régions variables des chaînes légères et lourdes des anticorps produits par les cellules B mémoire ont été amplifiées par une nouvelle stratégie de PCR et ensuite utilisées dans la production de nouveaux anticorps monoclonaux [232]. Différents « primers » ont été conçus pour amplifier des gènes d'anticorps même fortement mutés en s'hybridant avec les régions les moins mutées sur les séquences d'anticorps [228]. Comme pour les AcMNL, les plus puissants présentent des degrés inhabituellement hauts d'hypermutations somatiques [225]. Selon leur capacité de neutralisation des souches de VIH, plusieurs anticorps ont été sélectionnés et parmi eux les variants NIH45-46 et 3BNC60 du VRC01. Ces anticorps sont dirigés contre des motifs de liaison sur la gp120 similaires à ceux du VRC01. Les nouvelles classes d'anticorps anti-CD4bs ont une grande activité agoniste (Highly Active Antagonist anti-CD4 binding site antibodies) (HAAD). Cette liaison expose le site du corécepteur de la gp120 et imite la liaison au CD4 de l'hôte [232]. Ces anticorps partagent des séquences consensus d'IgVH et IgVL dont les résidus sont impliqués dans le contact entre VRC01 et les spicules du VIH. Chez 5 patients différents, ces anticorps proviennent de seulement deux gènes d'IgVH étroitement liés et trois gènes d'IgVL. La partie variable des chaînes lourdes de la plupart des nouveaux AcMNL et VRC01 ont environ 68% de leurs séquences d'acides aminés qui sont communes, partagent la même origine et proviennent de deux gènes de la lignée germinale, IgVH1-2 ou IgVH1-46. En outre, la structure cristalline des régions Fab d'un des nouveaux anticorps à large spectre, 3BNC60, est similaire à celle de VRC01, suggérant qu'il lie la gp120 de la même façon, imite la liaison au CD4 et interfère avec les trimères d'enveloppe.

Plus récemment, la structure de la variante clonale la plus intéressante de VRC01, NIH45-46 a été décrite plus en détails [233]. Cet anticorps ressemble à VRC01 mais inclut l'insertion de 4 résidus (résidus 99a-99d) dans son CDRH3, une propriété acquise par hypermutation somatique. Trois de ces résidus sont importants dans la liaison à la gp120 et pour l'activité neutralisante. La neutralisation par NIH45-46 est

plus puissante que celle par VRC01 puisque sur 82 virus Tier 2 et 3 représentant tous les clades connus, 62 virus ont été neutralisés mais il est moins puissant que le 3BNC117 [189, 232]. Dans la même étude, la capacité de VCR03 à lier la gp120 et à augmenter l'activité neutralisante en modifiant les zones de contact avec la gp120 a été tentée par la construction d'une nouvelle variante de NIH45-46 après substitution par le tryptophane. Les mutants obtenus ont une capacité de neutralisation augmentée puisqu'ils neutralisent six souches résistantes au NIH45-46, ce qui fait de ce variant d'anticorps NIH45-46^{G54W}, un des rares anticorps monoclonaux qui peut être candidat dans la conception d'un nouveau vaccin.

Afin d'obtenir des anticorps neutralisants dans le sérum d'un patient africain infecté par une souche du VIH clade A [234], Bonsignori et al., a combiné différentes méthodes de purification de cellules B mémoire, des systèmes de culture de lignées monoclonales ou oligoclonales, de tri cellulaire par cytométrie de flux, de transformation EBV et d'anticorps recombinants [235]. Une famille d'anticorps de même lignée clonale qu'AcMNL a été identifiée dont des AcMNL dirigés contre l'épitope quaternaire (CH01-CH04), ou le site de liaison du CD4 (VRC01-like) les CH30, CH31, CH32, ou la boucle V3 (CH19) et un nouvel anticorps neutralisant la gp41 reconnaissant les sites des 3 glycanes de la gp41, CH11. Les anticorps CH01-04 reconnaissent l'épitope conformationnel dans la région V2/V3. Comme les anticorps monoclonaux PG9 et PG16, les CH01 à CH04 reconnaissent un épitope sur un seul protomère qui est généralement, mais pas exclusivement, relié à la formation du trimère de gp120 [235-237]. Les anticorps monoclonaux CH01 à CH04 se lient à l'épitope conformationnel de PG9/PG16, mais présentent des différences dans leur niveau de neutralisation et dans leur sensibilité à des résidus par comparaison au PG9/PG16. Ils neutralisent 36% (CH02) à 47% (CH04) de 91 pseudovirus Tier 2. Toutefois, quand CH01 et VRC-CH31 sont combinés, ils neutralisent 86/91 (95%) des souches de VIH-1 [238]. Les anticorps CH01-04 partagent les mêmes réarrangements V (D) J, la même longueur de CDRH3 et une similarité élevée avec CDRH3 et CDRL3, indiquant ainsi leur appartenance à même famille clonale. Les mutations somatiques des séquences nucléotidiques de VDJ de CH01 à CH04 (11.5 à 14.3%) sont similaires à celles des anticorps monoclonaux PG9 (11.9%) et PG16 (13.2%). De la même façon que pour les anticorps neutralisants anti-MPER, l'anticorps monoclonal CH03 est polyréactif avec la protéine E2 du virus de l'hépatite C ou les antigènes de la flore intestinale. Cette autoréactivité pourrait potentiellement induire des mécanismes de tolérance comme l'anergie ou leur suppression [221-222]. Comme le PG9/PG16, les anticorps neutralisants CH01/CH04 présentent une longue région CDRH3. Ceci suggère un mécanisme commun de la production ou de la sélection des anticorps avec un long CDRH3.

Récemment, l'anticorps humain mAb2909, isolé par immortalisation des PBMC d'un patient VIH-1 asymptomatique n'ayant pas reçu de traitement [239], se lie à la structure quaternaire des virus exprimant seulement V2, V3 et le site de liaison de CD4 mais pas à la gp120 monomérique soluble [240-241]. Cet anticorps montre une activité neutralisante élevée pour les isolats primaires comme SF162. Son activité neutralisante contre SF162 est 750 à 100,000 fois plus importante que celle

observée pour les AcMNL décrits. Le SF162 contient un polymorphisme rare, consistant en la substitution d'un acide aminé dans le domaine V2 (K¹⁶⁰ non permissive pour la N-glycosylation). Cette substitution mène à la perte du site conservé de la N-glycosylation qui est essentiel pour l'épitope de PG9 et de PG16 [215]. L'apparition des anticorps monoclonaux 2909 suggère l'existence possible d'anticorps additionnels spécifiques des oligomères et possédant une large activité neutralisante.

Monoclonal Antibodies	Isotype	Epitope On	Epitope Core	Epitope type	Clade neutralizing	Polyreactivity	References
2F5	IgG1	Gp41	MPER 663-683 663 ELDKWA 688	Linear	IIIB, MN, RF, and SF2	Cardiolipin Phospholipid the centromere B autoantigen	[199, 242, 243]
4E10	IgG1	Gp41	MPER 671-676 671 NWF(D/N)IT 676	Linear (discontinuous)	A (DJ259, 92RW026 and 92RW009) C (94ZW106, DJ258, and DU151) B (JR-FL and HxBc2) E (CM235 and 92TH001) F (BZ162 and R1) G (G3 and RU570)	Cardiolipin, histone, dsDNA, the systemic lupus erythematosus autoantigen SS-A/Ro	[107, 242]
Z13e1	Fab	Gp41	MPER 671-676 671 NWF ⁶⁷⁶ DIT	Linear (conformational)	B (JR-FL) C (94ZW109) E (CM235)	Cardiolipin	[107]
HK20	IgG	Gp41 HR1	562 QQHLLQLTVW 576 GIKQL	Linear (conformational)	A 92RW009 B SF1262 C 92BR025 BC CH110.2 CRF01 VI 1888 CRF02 VI 1090	-	[84, 212, 244]
PG9 PG16	IgG	Gp120 Trimer	V2 and V3 loop	Conformational	A 94UG103, 92RW020 B JRCSF, APV-17, APV-6 C 93IN905, IAVI C22, IAVI C18, IAVI C3 D 92UG024 CRF01_AE CMU02	-	[215]
VRC01	IgG	Gp120	CD4 binding site	Conformational	100% clade A 96% clade B 87% clade C 88% clade D 89% CRF01_AE 81% CRF02_AG 90% clade G 100% CRF07_BC	-	[141, 178, 189, 233]
B12	IgG1	Gp120	CD4 binding site	Discontinuous	B primary JR-FL, JR-CSF, III B	-	[207]

Tableau 1: Tableau récapitulatif des anticorps neutralisants décrits contre la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1.

4.2. L'immunogénicité de la gp41

Les AcMNL qui ont été décrits dans la section précédente ont tous été découverts après 2009. En effet, grâce aux avancées technologiques des méthodes de séquençage et de développement de nouveaux anticorps monoclonaux recombinants, l'étude des anticorps neutralisants a fait un bond considérable et a redonné l'espoir de découvrir de nouveaux outils pour l'élaboration de vaccins préventifs ou thérapeutiques. A ces avancées technologiques s'ajoutent les études comme CHAVI ou l'étude approfondie des populations de patients infectés à l'échelle mondiale qui ont été inclus dans des essais cliniques de vaccins anti-VIH comme RV144. Ces études ont permis d'avoir une vision globale de l'évolution et de la

maturation des anticorps monoclonaux ainsi que d'observer les épitopes cruciaux pour la neutralisation et conservés dans les clades de VIH-1.

La gp41 est en grande partie protégée par des interactions quaternaires au sein de l'enveloppe native [63-64, 246-248]. Durant le processus de fusion, les changements conformationnels survenant après l'interaction avec la gp120 exposent les différentes régions de la gp41 accessibles aux anticorps neutralisants. Certaines de ces régions exposées sont essentielles pour le processus d'infection et leur blocage peut inhiber l'infection et neutraliser le virus (cf. Tableau 1). Les anticorps neutralisants 2F5, Z13e1 et 4E10 peuvent spécifiquement se lier à l'enveloppe et bloquer l'étape finale du processus de fusion [110, 249-252]. Malgré des variations considérables, des titres élevés d'anticorps neutralisants contre l'un des sites conservés de l'enveloppe n'ont pas été encore observés [188, 253-254]. Récemment, les anticorps HK20 spécifiques de la gp41 ont été obtenus à partir des cellules B mémoire immortalisées de patients infectés par le VIH-1 [212] (cf. Tableau 1). Cet anticorps cible les régions hydrophobes conservées du HR1. La structure cristalline de l'anticorps monoclonal humain HK20 complexé avec le domaine 5 en hélice de la gp41 montre que le HK20 se lie à la région reconnue par le D5, un anticorps humain dirigé contre la région HR1 [93], mais diffère significativement pour les sites de contact et montre le rôle des mutations somatiques dans la maturation de l'affinité [255]. Ces aspects influencent la puissance et l'ampleur de la neutralisation, qui sont forts pour HK20 en comparaison avec D5 et dépendent des résidus mutés. En outre, il a été montré que dans le cas de HK20, le scFv est au moins 15 fois plus puissant en neutralisation que l'IgG ce qui est cohérent avec un accès limité au site cible [256]. Les encombrements du HK20 et du D5 et les structures reconnues par les 2 anticorps sont similaires sur la gp41. HK20 cible HR1 au lieu de MPER ou les glycanes dans cette région, et présente l'avantage important sur le 4E10 et le 2F5 de n'avoir aucune autoréactivité [256]. Le HK20 présente un niveau de neutralisation intermédiaire, de préférence sur des clades A et C, qui ne correspondent pas au sous-type du patient infecté dont il est issu qui est le CRF02_AG [244]. Ce patient présentait une faible charge virale sans traitement au moment du prélèvement de ses cellules B mémoire [244]. Les anticorps se liant à des trimères de NHR ont été détectés dans les sérums des patients VIH-1 positifs indiquant le potentiel immunogénique de ces trimères [257]. De plus, l'AcN D5 spécifique du trimère NHR a été généré à partir d'une librairie de fragments de chaînes variables. De la même manière que le peptide T-20, D5 inhibe l'assemblage *in vitro* de la fusion intermédiaire [93]. Ces études indiquent le potentiel du trimère NHR à être une cible dans la conception du vaccin. D5 est dérivé des cellules de sujets VIH naïfs et n'a pas fait l'objet d'hypermutations somatiques, avec seulement 7 changements d'acides aminés dans des régions déterminantes non complémentaires (CDR) de la séquence de la lignée germinale. Contrairement à b12, 2F5 et 4E10, D5IgG ne présente pas de séquence atypique des CDRH3. D5 garde une activité anti-virale contre les isolats primaires du VIH lorsqu'il apparaît sous forme IgG1. Enfin et le plus important, D5 a été purifié en se liant au IZN36 et au 5H qui sont des antigènes synthétiques avec une structure bien définie mimant la structure en faisceaux avec 6 hélices (6 helix bundle). De plus, les nouveaux anticorps comme 8K8 et DN9 dont le potentiel de reconnaissance du trimère NHR du

VIH-1 est limité ont été isolés par criblage d'une banque de phage-display [258]. Les études de compétition des anticorps monoclonaux 8K8, DN9 et D5 pour leur liaison à l'antigène montrent que les épitopes de 8K8 et DN9 sont étroitement liés mais différent de l'épitope du D5. Le D5 se lie préférentiellement aux peptides mimant NHR en l'absence du peptide CHR ce qui indique une réaction du D5 avec les NHR de la structure en 6 hélices immobilisées [93, 255]. De même, le peptide C34 représentant le HR2 entre en compétition efficacement avec la liaison de 8K8 et DN9 sur les peptides mimant le NHR immobilisé (ex. hélice 5 et IZN36), mais pas avec D5. Le Fab 3764 a également démontré qu'il se lie à la région NHR avec la même efficacité qu'aux peptides mimant le NHR formant une superhélice (coiled-coil) N35CCG-N13 [258] ou sous forme libre ou en interaction avec le peptide du CHR sous la forme 6HB [259-260]. Comme décrit plus tôt, la gp41 comprend plusieurs régions fonctionnelles qui jouent un rôle important dans la fusion des virus et des membranes des cellule hôtes. Ces régions ne sont pas statiques durant le processus d'infection mais conservent un degré de flexibilité. Ainsi, les régions HR du 6HB coiled-coil jouent un rôle important dans les étapes précoces et tardives du processus de fusion membranaire [49, 87, 261-263] en incluant la formation de pores de fusion [263-265]. Le Fab 3674 est dirigé contre le 6HB et neutralise diverses souches de laboratoire de clade B et des isolats primaires des sous-types A, B et C [260]. D'autres anticorps neutralisants ont été décrits contre cette structure et montrent une activité neutralisante contre les isolats primaires [266].

MPER contient l'épitope de 3 anticorps neutralisants à large spectre bien connus, 2F5, 4E10 et Z13 [107, 267]. Récemment, des anticorps spécifique du MPER ont été caractérisés chez un patient infecté de manière chronique par le VIH de sous-type C (CAP206). Ces anticorps présentent un large spectre de neutralisation et ciblent tous la partie distale du MPER centrée sur le résidu D674 (asparagine) [268]. La purification d'un nouvel anticorps spécifique du MPER (CAP206-CH12) du même individu a également été réalisée par l'amplification des fragments du gène Ig des cellules B mémoire [269]. Cet anticorps monoclonal chevauche les épitopes du 4E10 et du Z13e1. Le CAP206-CH12 utilise les mêmes familles de gène VH et Vk Ig que le 4E10 et sa séquence CDRH3 montre une forte similarité avec le Z13e1 ce qui peut être expliqué par un gène J commun. Le CAP206-CH12 présente une faible activité neutralisante et un potentiel limité, similaire à Z13e1, et réagit contre deux sous-types, B et C, du virus. L'anticorps monoclonal CAP206-CH12 qui est polyréactif, contrairement aux 2F5 et 4E10, ne se lie pas aux lipides avec une grande avidité. Ces données suggèrent la possibilité d'une évolution convergente entre les anticorps monoclonaux anti-MPER du VIH-1. CAP206-CH12 utilise le VH1-69 et le Vk3-20 de manière similaire à l'anticorps 4E10. D'autres anticorps de la gp41, comme le D5 et le HK20, qui se lient au noyau de la gp41 utilisent aussi le VH1-69. Les anticorps dérivés du VH1-69 sont hydrophobes et semblent montrer une préférence pour les régions de l'enveloppe du virus qui sont proches de la membrane virale. CAP206-CH12 partage les mêmes motifs YYMD dans sa CDRH3 que le Z13e1. La CDRH3 du CAP206-CH12 est plus courte que celle du Z13e1 et présente des résidus flexibles adjacents au motif Tyr mais il lui manque, pour la neutralisation, les résidus hydrophobes W ou F présents dans le 4E10 et le Z13e1, au niveau de la partie haute

du CDRH3 et qui sont cruciaux pour la neutralisation [270-271]. Les anticorps spécifiques du MPER présents chez les patients infectés ne sont pas aussi largement neutralisants que le 2F5 et le 4E10 [89, 272-273]. Les études récentes utilisant les pseudovirus chimériques représentant les épitopes dans un contexte plus étroitement lié à la structure du MPER, suggèrent que les anticorps neutralisants sont relativement rares et même absents durant l'infection naturelle. Cependant, le fait que les nouveaux anticorps neutralisants reconnaissent des régions différentes du MPER que le 2F5 et le 4E10 suggère que des vaccins induisant des anticorps neutralisants sont réalisables [274-275]. A ce jour, le manque d'effet neutralisant contre le MPER observé dans des sérums peut être dû à une faible concentration ou l'absence d'anticorps neutralisants. Cette question de la quantité et de la qualité du virus n'a pas été entièrement résolue mais a une implication significative dans le développement des vaccins. Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'anticorps 2F5 possède un fort effet neutralisant. Dans les modèles animaux, il a été démontré qu'il empêche la transmission muqueuse du VIH-1 et apporte une protection contre l'infection par le SVIH [276]. L'anticorps 2F5 a été isolé à partir des cellules B humaines immortalisées et reconnaît un épitope situé entre l'acide glutamique 662 et l'alanine 667 (ELDKWA). Les études ont montré, à l'aide d'une bibliothèque d'expression et des expériences de protection contre la protéase, que cet épitope est en fait plus large (EQELLELDKWASLWN). En ajoutant une leucine de chaque côté (LELDKWASL), l'affinité pour cet épitope augmente 2000 fois [111, 277-279]. Dans les modèles qui étudient l'implication de la membrane virale dans la reconnaissance et la liaison à cet épitope, en utilisant le POPC (1-oleyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et le POPC/cholestérol, il a été démontré que le 2F5 n'interagit pas avec la membrane avant sa fixation [280]. En l'absence d'un environnement hydrophobe, le 2F5 et le 4E10 sont incapables de se lier à la région MPER [111]. Récemment, il a été montré que la liaison avec le 2F5 réalise un ancrage du peptide dans la membrane et augmente la puissance de l'anticorps [112]. Le 2F5 induit un désordre local au niveau de la membrane qui peut favoriser l'exposition et l'interaction avec la gp41. L'épitope reconnu par le 2F5 contient la conformation β -turn immunogène qui lorsqu'elle est présentée dans un contexte similaire peut mieux imiter l'épitope et par conséquent améliorer la liaison de cet anticorps [277]. En outre, la polyspécificité du 2F5 et du 4E10 et l'auto-réactivité en se liant à la cardiolipine peut expliquer la faible activité *in vivo* de ces anticorps, car le système immunitaire déplete toutes les cellules B qui produisent des anticorps auto-réactifs [242] et induit les mécanismes de tolérance [281], même si parfois, l'auto-réactivité peut être liée au développement des AcNL contre le VIH comme c'est le cas de l'anticorps neutralisant 9G4 qui présente une auto-réactivité comme dans le LED et des propriétés neutralisantes [282].

L'anticorps neutralisant 4E10 est aussi un anticorps spécifique du MPER. Il a été isolé à partir des cellules B de patients VIH. Il se lie à un épitope du MPER et présente une activité neutralisante contre les isolats primaires et les souches de laboratoire du VIH-1. Le 4E10 se lie à un épitope linéaire hautement conservé dans le MPER 671 NWF (D/N) Π^{676} [107]. La structure cristalline de l'épitope a été caractérisée et présente une forme hélicoïdale avec des résidus importants du côté

de l'hélice [283]. Cet antigène réagit seulement avec les résidus de la base et du centre de la boucle de CDRH3. Cependant, une grande partie de cette boucle n'est pas impliquée dans sa liaison à l'antigène. Le sommet de la boucle de CDRH3 du 4E10 forme une surface hydrophobe plate qui suggère une interaction possible avec la membrane virale. Les modélisations de structure prédisent que la formation de l'épitope du 2F5 et du 4E10 serait hautement dépendante de la présence de la membrane puisque l'affinité du 4E10 augmente avec la présence de lipides [284]. Les résidus W⁶⁷², F⁶⁷³, T⁶⁷⁶ semblent être cruciaux dans la liaison du 4E10 car leur substitution par des résidus alanine réduit drastiquement leur affinité [285].

La séquence ⁶⁷¹NWFDITNWLWYIK⁶⁸³ est optimale pour la reconnaissance du 4E10. Dans les souches résistantes, le motif NWF (N/D) IT montre que l'épitope du 4E10 est plus complexe et serait même discontinu [283]. Les études de spectrométrie de masse révèlent que le 4E10 se lie au N-terminal de la gp120 et de la gp41 dans leur conformation native [251]. Il a été proposé que le modèle NWF (N/D) IT forme un épitope cryptique accessible seulement durant les étapes intermédiaires de la fusion. Il semble que le 4E10 a une affinité plus élevée pour la membrane que le 2F5 conférant ainsi la capacité de l'extraction des peptides de la bicouche lipidique de la membrane [112]. L'anticorps 4E10 a également une polyspécificité pour les antigènes tels que l'histone ou l'ADN double brin. Le Fab du Z13 est également dérivé d'un anticorps spécifique du MPER. Cet anticorps issu de bibliothèques d'expression, reconnaît un épitope localisé dans la région C-terminale de l'épitope du 2F5 et qui recouvre l'épitope du 4E10. L'épitope du Z13 est centré sur la séquence ⁶⁷¹NWFDIT⁶⁷⁶ et serait dépendant de la conformation de ce motif et de ses modifications comme les N-glycosylations de l'asparagine (D)⁶⁷⁴ ou l'exposition dans une protéine native. Cet anticorps est capable de neutraliser faiblement plusieurs clades tels que B, C et D [107].

Plusieurs études pharmacocinétiques *in vivo* et des essais cliniques de phase VII utilisant de fortes doses des 3 anticorps neutralisants 4E10, 2F5 et 2G12 combinés ont été administrés par intraveineuse à 14 patients infectés par le VIH-1 à intervalles hebdomadaires pendant 3 mois. Les résultats montrent que ces 3 anticorps sont capables de maintenir une charge virale à un niveau indétectable chez les patients dont l'infection a été contrôlée par un traitement antiviral [286]. Ces études montrent également que l'administration de 4E10 n'est pas fortement immunogène puisque les IgM anti-4E10 étaient rares et leur titre peu élevé et il n'y a pas d'IgG produites. La clairance et la demi-vie du 4E10 sont identiques à celles des autres traitements classiques par les anticorps.

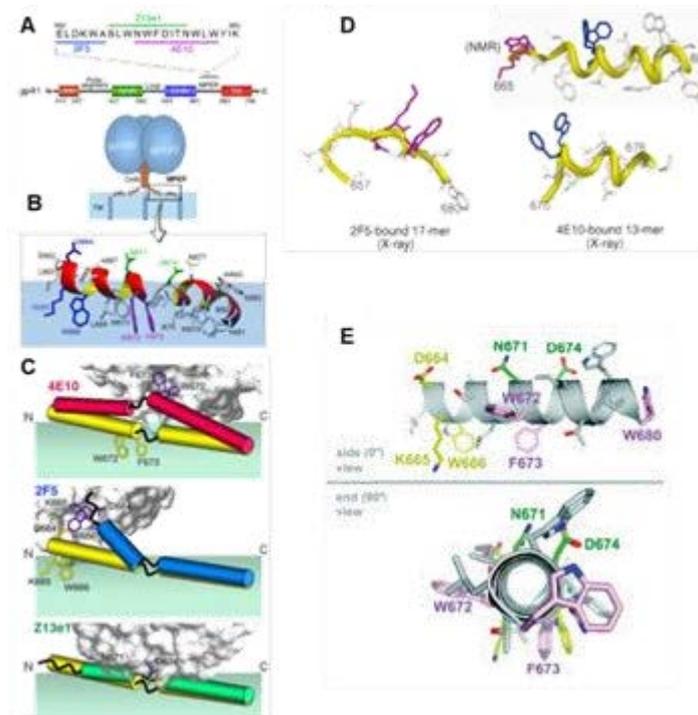


Figure 16: Différentes représentations du MPER et de son interaction avec le 2F5, 4E10 et Z13. A) Représentation schématique de la gp41 du VIH-1, avec le peptide de fusion (FP); NHR et CHR, les régions heptad repeat en forme d'hélice, et la région transmembranaire (TM). Les épitopes reconnus par le 2F5 sont indiqués en bleu, Z13e1 (vert), et 4E10 (magenta). B) Un modèle simplifié de l'enveloppe incluant MPER et TM, basé sur les données en 3D des trimères d'enveloppe du VIH-1/SIV-1 et la structure en NMR MPER du HXB2 dans une surface représentant la surface virale (plan bleu). Le résidu N674 a été présenté au lieu du D674. C) Modélisation des changements d'orientation du MPER induits par 4E10, 2F5, et Z13e1. Le MPER libre (cylindres jaunes) est immergé dans la bicouche lipidique (plan vert clair). Les cylindres en rouge, bleu, et vert représentent les orientations schématiques que subit le MPER complexé avec 4 E 10, 2F5, et Z13e1 (gris). Les résidus cruciaux pour la liaison sont indiqués d'abord en (jaune) ensuite en (violet) [287]. D) Représentation en tube du CHR sous forme hélicoïdale (haut, jaune), montre la partie N-terminale de l'épitope du 2F5, en rose sont indiqués les résidus nécessaires pour le 2F5 et pour 4E10, l'épitope est coloré en bleu. [288]. E) Modèle du MPER (DKWASLWNWFDITNWLW) comme décrit par Nelson et al, [250].

4.3. Conclusions

L'administration passive des rares AcNL spécifiques de l'enveloppe humaine, aux rhésus macaques peut les protéger lors d'une inoculation de SVIH [289-294]. La détection d'un titre élevé d'anticorps neutralisants spécifiques de la gp120 est corrélée avec une protection de 31% chez l'homme dans l'étude clinique récente RV144 THAI. En outre, les indices obtenus grâce aux avancées technologiques du protocole G et les très récentes études CHAVI ont confirmé que l'objectif majeur du développement du vaccin VIH est de concevoir un antigène représentant l'enveloppe fortement immunogène capable d'induire des anticorps neutralisants [243, 292, 295]. Les données des études cliniques démontrent que la première génération de

protéines solubles et d'immunogènes de l'enveloppe vectorisés sont non toxiques et immunogéniques.

Cependant, les anticorps produits ne sont efficaces que contre les souches sensibles. L'un des principaux objectifs du développement d'un vaccin efficace est l'élaboration d'un immunogène mimant fidèlement la protéine virale d'enveloppe. A partir de la littérature récente, les HAADs et/ou PG ainsi que leurs réactions croisées avec les virus circulants, la gp120 semble être une cible immunogénique importante même si la couverture de neutralisation n'est pas complète ou que le bouclier de glycanes peut évoluer et masquer les épitopes potentiels.

L'utilisation de la gp41 comme cible pour un vaccin prophylactique peut être une autre alternative importante. Cependant, les épitopes de la gp41 sont accessibles pendant un laps de temps court du fait d'un changement conformationnel déclenché par le déroulement du processus de fusion. L'épitope HK20 récemment décrit peut être considéré comme un candidat sérieux pour l'approche vaccinale anti-VIH. En effet, les épitopes conservés de l'enveloppe ciblés par les anticorps neutralisants sont faiblement immunogènes parce qu'ils sont masqués par le bouclier de glycanes [177, 296], apparaissent transitoirement [297], subissent un encombrement stérique [140, 198], ou doivent surmonter l'entropie de la liaison des anticorps.

Un autre point important est que les épitopes conservés (particulièrement dans la gp41) présentent une homologie avec des protéines du soi qui peuvent déclencher un mécanisme de tolérance [221-222, 242]. Enfin, même lorsque les anticorps peuvent neutraliser les souches infectantes, leur effet est transitoire à cause des mutations d'échappement [177, 298]. A ce jour, l'immunisation des primates non humains et des humains avec des monomères et des trimères de l'enveloppe du VIH n'a pas réussi à induire des anticorps neutralisants à large spectre. Les anticorps induits sont efficaces principalement sur les souches Tier 1 facilement neutralisées, mais ont de faibles capacités neutralisantes pour les souches Tier 2 et 3 [292, 299]. La faible réaction croisée des anticorps neutralisants produits par les vaccins, semble être liée au répertoire restreint des anticorps induits et à la complexité de la structure des spicules du virus natif.

Tous les anticorps neutralisants décrits dans la littérature sont principalement des IgG. L'étude de la réponse neutralisante dans le compartiment muqueux est cruciale pour concevoir un nouveau vaccin. Plusieurs études ont décrit le rôle potentiel des IgA sécrétoires muqueuses pour bloquer l'infection localement. L'implication des SIgA anti-Env qui bloquent la transcytose et l'infection a été bien décrite [2, 6, 300]. Les IgA sécrétoires de la salive parotidienne ou du lait ont également été impliquées dans la reconnaissance de différents épitopes dans la gp160 comme la boucle V1/V2 et dans la gp41 et peuvent avoir aussi des propriétés neutralisantes [9, 301]. Cependant, le rôle des IgA reste controversé puisque des IgA sériques semblent être aussi associées à une perte de la réponse dans l'essai clinique THAI. Or les IgA jouent un rôle-clé dans l'immunité des muqueuses et une étude de leur rôle de protection notamment chez les personnes exposées non infectées peut amener des réponses importantes pour l'élaboration de nouveaux antigènes et de nouvelles stratégies thérapeutiques ou vaccinales.

5- Rôle des IgA dans la réponse immunitaire anti-VIH

5.1. Structure et fonctions des IgA

L'IgA est l'isotype principal des immunoglobulines présentes dans les sécrétions muqueuses, comme les larmes, la salive, le colostrum et les sécrétions provenant des voies génito-urinaires, du tractus gastro-intestinal, de la prostate et de l'épithélium respiratoire. Les IgA sont également présentes en faible quantité dans le sang. Les IgA sériques se présentent chez l'homme majoritairement sous forme monomérique (90%). Les IgA sont produites chez l'homme sous forme de 2 sous-types antigéniques correspondant aux sous-classes IgA1 et IgA2. La différence majeure entre ces deux isoformes se situe dans la région charnière, pour laquelle l'IgA1 présente une séquence riche en prolines, absente sur l'IgA2. La proportion de ces deux classes varie selon le site muqueux. En effet, on trouve entre 80-90% d'IgA 1 dans les muqueuses nasales et les sécrétions génitales mâles, 60 % d'IgA1 dans la salive, 60 % d'IgA2 dans le tractus intestinal et les sécrétions génitales féminines [302-303]. Au niveau des interfaces muqueuses, les IgA sont sécrétées par les plasmocytes de la lamina propria sous forme monomérique ou dimérique suite à l'addition de la chaîne J (cf Figure 15). Cette conformation dimérique leur permet de se fixer avec une forte affinité sur le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR) présent à la surface des cellules épithéliales [304-305].

Les IgA dimériques peuvent être produites sous forme sécrétoire par ajout d'une chaîne polypeptidique appelée composant sécrétoire (CS). Le CS est synthétisé par les cellules épithéliales des muqueuses. Il résulte, en effet, de la protéolyse du pIgR, synthétisé par les cellules épithéliales durant le mécanisme de transcytose. Le CS se lie à la forme dimérique d'IgA en partie *via* la chaîne J car il a une affinité particulière pour cette dernière (cf. Figure 17). Les IgA sécrétoires (SIgA) sont présentes dans la majorité des sécrétions externes. Le rôle du composant sécrétoire est de protéger les IgA de la dégradation par des protéases très fréquentes dans le compartiment muqueux ainsi que de stabiliser les IgA, leur conférant une efficacité accrue lors des mécanismes d'inhibition virale au niveau muqueux [306].

5.2 . Fonctions des IgA sécrétoires dans la réponse anti-VIH

Les SIgA constituent la première ligne de protection immunitaire contre de nombreux agents infectieux ciblant les muqueuses. Grâce à leur capacité à fixer leur récepteur cellulaire Fc α RI présent à la surface des neutrophiles, des monocytes, des éosinophiles ainsi que des macrophages et des cellules dendritiques, les SIgA peuvent être impliquées dans l'induction de mécanismes tolérogènes, d'exclusion immune ou d'induction d'une réponse protectrice (cf Figure 17 et 18) [308]. L'immunité protectrice médiée par les SIgA intervient au niveau de sites distants des sites inducteurs impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire.

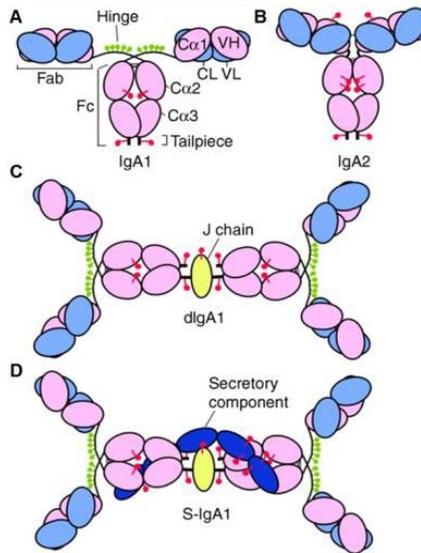


Figure 17: Représentation schématique des formes monomérique, dimérique (dIgA1) et sécrétoire (SIgA1) des IgA humaines. A) IgA1 B) IgA2 C) IgA1 dimérique D) IgA1 sécrétoire (SIgA1). Les chaînes lourdes sont indiquées en rose les chaînes légères en bleu. La pièce J en jaune et le composant sécrétoire en bleu. Sur les formes monomériques, les résidus O-glycanes sont représentés par des cercles verts, tandis que les résidus N-glycanes sont indiqués en bleu foncé. [307]

De façon générale, la réponse est plus marquée au niveau des sites effecteurs voisins du site inducteur par la domiciliation des cellules T et B et le drainage lymphatique. Par exemple, une stimulation antigénique au niveau intestinal peut induire la sécrétion de SIgA au niveau intestinal, buccal ou dans le lait maternel. Au contraire, une stimulation par le NALT induit une réponse immunitaire dans la salive et dans les muqueuses respiratoire et vaginale [308]. Classiquement les IgA sont considérées comme étant de faibles activateurs de la cytotoxicité cellulaire médiée par le complément. En effet, les réponses immunitaires muqueuses entraînent un état physiologique de tolérance particulier du fait de leur caractère non inflammatoire. Cependant lors d'une infection par le VIH, les SIgA participent à la réponse immunitaire muqueuse en neutralisant le virus via l'interaction directe avec les antigènes particuliers ou par interaction indirecte par ADCC [310, 311]. Les SIgA neutralisantes ne se contentent pas de cibler les antigènes de surface mais elles peuvent se lier à des protéines intracellulaires comme il a été décrit pour la protéine de capsid p24 du VIH [312]. Une des propriétés les plus intéressantes des SIgA réside dans leur capacité neutralisante anti-VIH basée sur leur spécificité contre les protéines d'enveloppe. Le rôle protecteur des SIgA a été largement abordé dans la littérature notamment chez les sujets dits ESN (Exposés Séronégatifs) [6, 313-317].

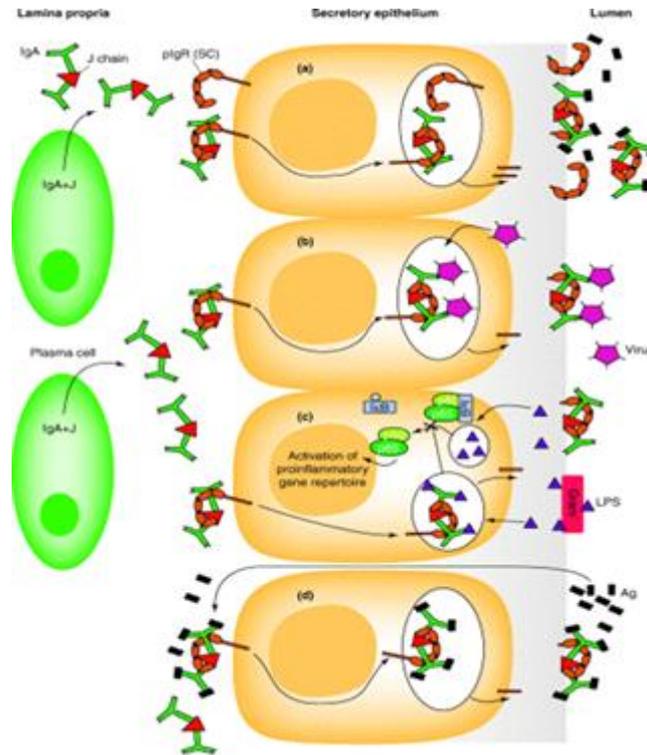


Figure 18 : Représentation schématique de 4 modes de défense non-inflammatoires induits par les SIgA. (a) Suite à leur transcytose médiée par le pIgR, les SIgA fonctionnent comme des anticorps bloquants dans l'exclusion immunitaire au niveau des muqueuses. (b) Mécanisme de neutralisation intracellulaire. Les IgA dimériques peuvent bloquer les virus au sein de la cellule infectée lors de leur transcytose et ainsi inhiber une éventuelle réplication virale dans ces cellules. (c) Neutralisation intracellulaire des endotoxines comme le LPS (lipopolysaccharide) inhibant ainsi l'activation de la voie NF- κ B pro-inflammatoire dans les cellules épithéliales. (d) L'exclusion immune peut se faire dans la lamina propria contre des antigènes qui ont préalablement pénétré dans la barrière muqueuse [309].

Ces sujets présentent la caractéristique d'être en contact avec le VIH au cours de rapports sexuels non protégés le plus souvent, sans pour autant présenter une séroconversion attestant de leur infection. Ces sujets présentent plusieurs caractéristiques immunitaires [318] leur conférant une protection antivirale comme la production de certaines chémokines ou de défensines au niveau des muqueuses. En plus de ces facteurs, des SIgA neutralisantes dirigées contre la glycoprotéine d'enveloppe ont été décrites au niveau des muqueuses. De récentes études démontrent l'induction de SIgA neutralisantes chez des hommes ESN à la suite d'une exposition au VIH au niveau muqueux. En effet, la capacité neutralisante des SIgA serait liée à la charge virale mesurée chez leur/s partenaire/s sexuel/s séropositif/s [319]. Ces SIgA neutralisantes dérivent d'une alloimmunisation liée à un comportement à risque favorisant l'exposition aux particules virales au niveau muqueux. Ces propriétés neutralisantes sont corrélées à l'exposition au virus mais non à la fréquence de cette exposition. En effet, les personnes ayant eu le plus de relations buccogénitales ont des taux salivaires de CC-chémokines élevés comme CCL2, CCL4, CCL5 et CCL11, favorisant la neutralisation du VIH-1 [320]. Les SIgA

neutralisantes anti-enveloppe sont dirigées contre plusieurs épitopes de la gp160. Les études de Planque et al. décrivent des SIgA neutralisantes spécifiques du motif 416-433 du site de liaison du CD4 sur la gp120. Ces SIgA agissent en induisant une hydrolyse de la gp120 [321-323]. Au sein de notre laboratoire, nous avons pu démontrer que les IgA sériques et muqueuses (présentes dans la salive parotidienne) étaient capables de reconnaître d'autres épitopes sur la gp120 comme les boucles V1/V2 ou interfèrent avec l'interaction de la gp120 et le site de liaison au CD4 [8-9, 324]. Ces anticorps présentent des propriétés neutralisantes assez fortes à large spectre. Des SIgA dirigées contre l'enveloppe ont aussi été décrites à la suite d'une infection aiguë [325]. Les travaux de Devito et al. [6] ont montré la capacité des SIgA d'inhiber la transcytose épithéliale de souches virales VIH-1 de clades différents chez les ESN sans doute par une reconnaissance croisée d'épitopes conservés. Devito *et al* a suggéré une reconnaissance de plusieurs épitopes conservés sur la gp41 du VIH-1 qui diffèrent des épitopes reconnus par les individus séropositifs au VIH-1 comme décrit précédemment [3, 326]. Des IgA sériques fonctionnelles neutralisantes, ont été décrites chez des ESN. Ces anticorps ciblent les motifs QARILAVERY et QARILAV (épitopes dans la région en super hélice de la gp41 [5, 326]. L'immunisation muqueuse de macaques à l'aide de virosomes contenant ces motifs a permis leur protection lors de l'administration vaginale de SHIV en produisant des SIgA spécifiques de la gp41 dans leurs sécrétions vaginales [300]. Les motifs QARILAVERY et QARILAV correspondent à l'épitope immunosuppresseur de la gp41 [327].

Des études récentes chez les primates non humains indiquent que les anticorps anti-gp41 préexistants, peuvent avoir un rôle fonctionnel important dans la protection contre l'infection [310]. Durant l'infection aiguë, les réponses humorales surviennent trop tardivement pour être efficaces dans le contrôle de la réplication du VIH-1 [328]. Les anticorps muqueux dirigés contre le VIH présents au moment de la transmission peuvent bloquer la pénétration du VIH. Les mécanismes par lesquels les SIgA peuvent inhiber la dissémination du VIH-1 à travers la barrière muqueuse incluent la neutralisation directe du virus, l'agrégation virale, l'inhibition de la transcytose, la neutralisation intra-épithéliale, la phagocytose, l'inhibition non spécifique par le biais de mucus et la neutralisation médiée par les récepteurs Fc comme l'ADCC [303]. L'analyse de ces réponses muqueuses précoces durant l'infection par le VIH-1 permettra de mieux comprendre les effets du VIH-1 sur l'induction de réponses B [325]. L'apparition des SIgA anti-gp41 dans les fluides génitaux lors d'une infection aiguë par le VIH et l'apparition tardive des SIgA dirigées majoritairement contre la gp120 ont récemment été décrits. Ces travaux démontrent une réponse SIgA muqueuse anti-gp41 dont la demi-vie diminue au cours de l'infection [325]. Cependant, la raison de l'orientation de la réponse initiale vers la gp41 plutôt que la gp120, n'est pas entièrement comprise. Toutefois, il a déjà été rapporté que la réponse IgG anti-gp41 peut provenir de cellules B mémoire préexistantes « cross-réactives » qui sont davantage activées par l'infection par le VIH-1 [329]. Il a aussi été rapporté que durant l'infection aiguë, les SIgA spécifiques anti-gp41 ont une demi-vie très courte (2,7 jours) au niveau muqueux et 48 jours au niveau systémique [325].

Les SIgA dirigées contre l'enveloppe peuvent présenter la capacité d'induire une réponse de type ADCC. Cette activité est souvent observée lors de l'allaitement par des femmes VIH⁺. En effet, au niveau du lait maternel de femmes infectées de manière chronique, on peut retrouver de faibles quantités d'SIgA neutralisantes et/ou favorisant l'ADCC [330]. De plus, les réponses au niveau du lait maternel sont parallèles à celles observées au niveau du compartiment systémique, suggérant que les anticorps présents dans le lait dérivent largement du compartiment systémique, par exsudation [330].

Ce faible taux de neutralisation détecté dans le lait maternel peut indiquer que les anticorps non-neutralisants ou des facteurs immunitaires innés interviennent pour protéger les nourrissons contre l'acquisition post-natale du VIH. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le bénéfice potentiel de l'induction de taux élevés de puissants anticorps neutralisants dans le lait maternel suite à une immunisation. Un seuil d'antigène pourrait être nécessaire pour induire une réponse ADCC robuste. Plusieurs études ont suggéré que l'ADCC pouvait jouer un rôle important dans la lutte contre l'infection par SV et par VIH-1. Plusieurs études ont montré que l'amplitude des réponses ADCC liées aux anticorps est inversement corrélée avec le virus dans les infections aiguës SV chez les macaques non vaccinés et chez les animaux vaccinés après administration virale [331-332]. Chez l'homme, les anticorps médiant l'ADCC peuvent protéger contre l'infection par le VIH-1 dans la transmission mère/enfant. Leur présence est corrélée avec le contrôle de réplication du virus et l'absence de progression de l'infection [311]. En revanche, les anticorps faiblement neutralisants et non-neutralisants ne protègent pas contre l'infection virale (SHIV) suite à une administration vaginale chez le macaque [311, 333]

6- Vaccination muqueuse anti-VIH

La préparation d'un vaccin anti-VIH efficace reste aujourd'hui un défi scientifique majeur. L'extrême variabilité des paramètres qu'il intègre, l'absence de bons modèles animaux et la méconnaissance des mécanismes impliqués dans l'immunité induite au niveau muqueux, notamment, rendent ce but particulièrement difficile à atteindre. Les premiers essais vaccinaux anti-VIH-1 ont été conduits dès 1987 aux États-Unis et 1992 en France par l'Agence Nationale de Recherche contre le SIDA (ANRS). Jusqu'à présent, les approches développées pour les autres maladies virales, en utilisant par exemple du VIH vivant atténué ou inactivé, se sont avérées inefficaces. Selon le site « clinicaltrials.gov » plus de 618 études sur des candidats vaccins ont été réalisées à travers le monde. La plupart de ces tests portaient sur l'innocuité (essais cliniques de phase I). Les principaux candidats vaccins anti-VIH en phase II ou en phase III sont décrits dans le Tableau 2. Il s'agit majoritairement de vaccins prophylactiques. La réponse immunitaire spécifique induite par ces vaccins prophylactiques vise essentiellement à stimuler une réponse B mémoire et la sécrétion d'anticorps neutralisants dirigés contre l'enveloppe.

Plus récemment, des approches de vaccination thérapeutique ont également été décrites. Le but de ces approches réside essentiellement dans l'induction d'une réponse cellulaire anti-VIH1 afin de détruire les cellules infectées. Lors de l'infection par le VIH, la stimulation du système immunitaire (par des lipopeptides viraux ou encore des vecteurs viraux recombinants présentant des gènes du VIH modifiés)

pourrait permettre de maintenir une charge virale faible, tout en diminuant ou éliminant les traitements HAART.

a. Qu'avons-nous appris de l'étude des candidats vaccin contre le VIH-1?

Les premiers essais cliniques efficaces, VAX003 et VAX004, ont été réalisés avec un mélange de glycoprotéines de la gp120 du VIH-1 de deux souches virales différentes de clade B ou des souches virales de clades B et E. L'approche était basée sur l'idée que, comme c'est le cas avec de nombreux vaccins antiviraux commercialisés, les anticorps neutralisants empêcheraient la pénétration de l'agent pathogène. Cependant, cette approche est restée inefficace par la trop faible ampleur des anticorps induits [299], comme il a été démontré dans les modèles chimpanzé/VIH-1 et macaque/SHIV [334]. L'échec de cette approche vaccinale a conduit les chercheurs à stimuler les réponses immunitaires cellulaires. En effet, des observations tant chez le singe que chez l'homme ont montré que les réponses des lymphocytes T CD8⁺ sont cruciales dans le contrôle de la réplication virale [146, 335-336]. Ce changement de stratégie de vaccination a mené au développement d'un nouvel essai vaccinal nommé HVTN 502 conduit par la société Merck [337]. Pour ce faire, 3 vecteurs basés sur l'adénovirus non répliatif de type 5 (Ad5) ont été utilisés. Les adénovirus ont été utilisés pour leur meilleure efficacité par rapport à des plasmides d'ADN ou des vecteurs. Le vaccin consiste en un adénovirus comportant les gènes Gag, Pol et Nef. Les vecteurs viraux utilisés sont non répliatifs mais gardent néanmoins un pouvoir infectieux afin de pouvoir pénétrer dans les cellules-cible. Ce candidat vaccin a permis l'induction de réponses cellulaires cytotoxiques, cependant aucune protection contre la dissémination du VIH n'a été observée. L'étude a même dû être arrêtée précocement car un taux plus élevé d'infections chez les sujets vaccinés que dans le groupe contrôle a été observé. En effet, 49/914 cas ont été détectés chez les vaccinés, contre 33/922 pour le groupe placebo. A la suite de cet essai vaccinal, un nouvel essai clinique HVTN505 a été initié en octobre 2009 pour réduire la virémie chez les patients HIV⁺. Cet essai consiste en l'injection de doses multiples de plasmides d'ADN suivie d'une dose unique d'un vecteur Ad5, codant pour les protéines EnvA, EnvB, EnvC, Gag, Pol et Nef du VIH [338]. Le développement d'approches vaccinales par « prime-boost » est particulièrement prometteur car il semble permettre d'induire des réponses immunitaires cellulaires plus larges et plus fortes grâce, par exemple, à la combinaison d'un vaccin ADN avec un vaccin recombinant vivant voire deux vaccins recombinants ensemble. Des études cliniques de phase IIb sont en cours (DNA-Ad5) ou vont arriver dans un futur proche (DNA-MVA et éventuellement Ad35-Ad26) chez des patients porteurs du VIH1 [338].

L'étude vaccinale ayant marqué l'histoire du vaccin anti-VIH est l'étude dite « THAI RV144 » qui a été réalisée sur 16402 volontaires séronégatifs âgés de 18 à 30 ans. En effet, cette étude de par son ampleur est la première à avoir eu comme résultats une protection de 31,2 %. Cette protection semble être corrélée à la présence d'anticorps neutralisants et à l'induction d'une forte réponse T CD4⁺. Ce candidat vaccin consiste en une combinaison de deux vaccins différents qui ont

précédemment été testés en phase II chez l'homme. Cette stratégie vise à préparer la réponse immunitaire par l'administration d'un vecteur recombinant Canarypox (Alvac) et ensuite à le «booster» par une injection de la protéine d'enveloppe gp120 (Aidsvax utilisé dans l'essai VAX004). Cet essai a entraîné une protection modeste mais significative de 31% chez les volontaires à faible risque d'infection. Beaucoup d'efforts sont consacrés à la recherche de corrélats de protection dans cet essai, et même si cette conclusion reste provisoire, il semble que la présence d'anticorps non-neutralisants sériques dirigés contre la boucle V2 soient associée à l'absence de protection [339].

Les futures études cliniques construites sur les résultats de l'essai RV144 aideront à déterminer si un meilleur niveau de protection peut être réalisé de manière soutenue en utilisant différents composants plus immunogènes du vaccin, comme il a été récemment montré avec succès dans le modèle de macaque /SHIV utilisant des réplicons du virus de l'encéphalite équine vénézuélienne VEE pour le priming avec une préparation de trimères de l'enveloppe et d'adjuvant MF59 pour stimuler la réponse immune [340]. Les réplicons du VEE sont de puissants inducteurs de production de l'IFN et activent rapidement les gènes stimulés par l'IFN, conduisant à une protection non spécifique des infections virales. L'essai RV144 a été à l'origine de plusieurs découvertes et d'avancées sur les anticorps neutralisants. En effet, les deux principaux corrélats immunitaires observés sont la présence d'IgG anti-V1V2 dans le sang qui protègent de l'infection et des IgA se liant à l'enveloppe corrélée directement avec l'infection [339]. Ces deux corrélats du risque, pris ensemble, sont fortement corrélés avec les taux d'infection et conduisent à des hypothèses sur les réponses immunitaires nécessaires pour la protection contre le VIH-1 comme l'amélioration de la sélection des critères de vaccination. Ces observations suggèrent que les anticorps induits reconnaissent des épitopes conformationnels dans le motif V1V2, cette structure étant déjà connue pour sa reconnaissance par des anticorps conformationnels.

D'autres études complémentaires ont été réalisées suite à cet essai vaccinal. Tout d'abord, il a été démontré que le ratio des IgA/IgG spécifiques de l'enveloppe du VIH-1 est directement corrélé au risque d'infection, ce qui suggère que pour certaines spécificités, l'équilibre des IgA et des IgG anti-enveloppe est susceptible d'influer sur l'efficacité du vaccin. Il a aussi été démontré que les AcM IgA isolées de sujets vaccinés par le RV144 peuvent inhiber la liaison des IgG qui ciblent les mêmes épitopes induits par le vaccin et bloquer leur activité ADCC [332]. L'interférence des IgA avec les fonctions des IgG a déjà été décrite dans l'immunité de l'hôte contre les bactéries, pour la régulation des autoanticorps et pour l'activité ADCC des cellules infectées par l'EBV dans le cadre du cancer du nasopharynx [341]. Toutefois, ce mécanisme a été décrit la première fois pour des IgA induites par un vaccin et surtout quel type d'IgA dans les études de Tomaras et al. [332].

Dans cette étude, deux AcM, CH38 et CH57, ont été purifiés chez le même sujet vacciné. CH38 est une IgA2 possédant une affinité significativement plus élevée pour la protéine d'enveloppe que l'anticorps CH57 (IgG1). Les deux AcM se lient à la région C1 de la gp120. Une IgA pourrait donc avoir une affinité plus élevée pour son

épitope qu'une IgG pour le même épitope. Il a été récemment décrit que la version IgA2 du 2F5 avait une affinité (ou avidité) plus élevée pour son épitope que la forme native IgG [342]. Une autre étude a également démontré qu'un anticorps d'isotype IgA avait une affinité ~10 fois plus élevée qu'une IgG mAb (mAb anti-tubuline du sérum d'un patient atteint d'un lymphome) [343]. Ces données indiquent que les isotypes des anticorps peuvent influencer l'affinité ou l'avidité et suggèrent qu'il peut y avoir des différences dans la structure secondaire de la région constante dans le domaine CH1 et, éventuellement, les interactions avec VH ainsi que dans la longueur de la région charnière pouvant influencer les propriétés de liaison des anticorps. Des études de suivi de l'essai RV 144 sont en cours (RV305, RV306) pour rechercher la présence d'anticorps muqueux spécifiques.

En effet, les réponses immunitaires muqueuses n'ont pas été décrites lors de cet essai. En fait, très peu d'essais cliniques humains ont étudié les réponses immunitaires muqueuses à la suite d'une vaccination contre le VIH-1 sans doute à cause de la difficulté méthodologique de mesurer ces réponses et de la multitude de coinfections. Le premier rôle protecteur des anticorps neutralisants au niveau muqueux a été démontré lors de transfert passif de primates non-humains (PNH), à l'aide des anticorps neutralisants 2F5 et 2G12 contre les protéines gp41 et gp120. Ces premières études ont suggéré que les titres sériques élevés d'anticorps neutralisants sont généralement nécessaires pour la protection contre l'infection des muqueuses par le SHIV à forte dose [292, 344]. Plus récemment, il a été observé que les faibles titres d'anticorps neutralisants présents dans le sérum protégeaient également contre des immunisations muqueuses répétées de SHIV à faible dose. Une étude récente sur les femmes ESN a mis en évidence que l'exposition à un partenaire infecté par le VIH avec une faible charge virale plasmatique favorise l'induction d'IgA neutralisantes au niveau cervico-vaginal, pouvant contribuer à réduire la contamination par le VIH-1 [345].

Enfin, une protection complète *in vivo* chez les PNH a été récemment décrite suite à l'administration systémique des anticorps 2F5 et 4E10 [346]. Ces anticorps anti-MPER neutralisants sont déjà connus pour leur capacité à bloquer la transcytose et l'infection cellulaire *in vitro* [107], comme ce qui a été décrit pour les IgA muqueuses des ESN [2].

Un récent essai vaccinal chez les primates non humains a conduit à la production d'anticorps muqueux qui protègent les PNH contre une immunisation par voie vaginale avec des virus hétérologues [300]. 5 macaques sur 6 vaccinés par voie intramusculaire (première injection) et par voie nasale (rappel) étaient entièrement protégés. La protection est corrélée avec la présence d'SIgA vaginales anti-gp41 non neutralisantes capables d'inhiber la transcytose et dotées d'activité ADCC. Ces résultats ont clairement remis en question le paradigme que la protection muqueuse contre la transmission sexuelle du VIH-1 exige la présence d'IgG sériques avec une capacité de neutralisation virale. Cette étude a permis l'initiation d'un essai vaccinal de phase I chez des jeunes femmes non infectées. L'immunisation intramusculaire puis intranasale par des virosomes contenant le peptide P1 représentant la région MPER et la région HR1 a permis la production IgA circulantes et muqueuses dans l'intestin et le vagin ainsi que des IgG circulantes spécifiques [347]. Les anticorps produits, notamment les IgA muqueuses étaient capables de bloquer la transcytose

mais ne présentait aucune activité neutralisante. Ces résultats confirment les précédents chez les PNH [300] et l'utilisation de la gp41 lors d'une stratégie vaccinale pour induire des anticorps neutralisants muqueux et réduire le taux de transmission sexuelle.

Ces observations suggèrent que la gp41 est un immunogène intéressant pouvant être inclus dans les vaccins prophylactiques anti-VIH-1. La gp41 est mieux conservée que la gp120 et intervient dans le processus de fusion avec la membrane de la cellule cible. La gp41 comporte également le motif de fixation de récepteurs muqueux conservé utilisé par le VIH-1 pour la liaison au galactosyl-céramide présent à la surface des cellules épithéliales et dendritiques. Cet immunogène a été intégré dans un candidat vaccin développé par l'équipe de M. Bomsel conjointement avec la société suisse Mymetics et visant à stimuler des réponses muqueuses anti-VIH1. [347]. Ce motif ainsi qu'un trimère de la gp41 recombinante ont été exprimés à la surface de virosomes. Les liposomes ayant une double fonction. D'une part ils permettent une présentation de la protéine dans un contexte lipidique mimant la membrane bicouche lipidique ce qui est primordial pour la reconnaissance des anticorps [112]. D'autre part les virosomes peuvent être considérés comme des adjuvants.

Aujourd'hui, il est largement admis que les anticorps avec diverses fonctions antivirales et de différents compartiments pourraient jouer des rôles complémentaires pour une protection optimale [28].

7- Conclusions

Les échecs des essais vaccinaux ont permis d'entrevoir des pistes très prometteuses pour l'induction des réponses immunes protectrices efficaces contre le VIH. En effet, les DNA-adénovirus ou DNA-MVA en primo-administration présentent la capacité d'induire des réponses protectrices. D'autres vecteurs peuvent être envisagés comme le CMV qui déclenche des réponses multifonctionnelles effectrices des lymphocytes T de haute avidité [49]. Les VLP virosomaux gp41 semblent jouer un rôle important dans l'induction des réponses muqueuses et permettent une présentation des immunogènes comme les glycoprotéines dans des conditions mimant fidèlement le contexte membranaire [3, 314] et pourraient également jouer un rôle important. Bien qu'il soit imprudent de dire qu'un vaccin contre le VIH est proche, les perspectives sont probablement encourageantes.

Désignation	antigène vaccinale (souche VIH)	Méthode de production	Firme	Essai clinique
Vaccins basés sur l'enveloppe				
rgp160 (LAI)	(LAI)	Baculovirus/ cellule d'insecte	MicroGeneSys	Phase I
rgp160 (IIIB)	(IIIB)	Vaccin/ cellule Vero	Immuno-AG	Phase I
Env 2-3 (SF2)	(SF-2)	Levure	Chiron /BIOCINE	Phase I
rgp120 (IIIB)	(IIIB)	Cellules CHO	Genentech	Phase I
rgp120 (MN)	(MN)	Cellules CHO	Genentech	Phase I/II
rgp120 (SF2)	(SF2)	Cellules CHO	Chiron/BIOCINE	Phase I/II
rgp160 (MN)	(MN)	Vaccin/ cellule Vero	Immuno-AG	Phase I
rgp160(MN/LAI)	(MN/LAI)	Vaccin/ cellule BHK-21	Pasteur Merieux	Phase I/II
AIDSVAX gp120 (B/B)	(MN/GNE8)	Cellules CHO	VaxGen	Phase III
AIDSVAX gp120 (B/E)	(MN/A244)	Cellules CHO	VaxGen	Phase III
rgp120 (B/E)	(SF2/CM235)	Cellules CHO	Chiron	Phase II
rgp140 (E)	92TH023/LAI	Vaccin/ cellule Vero	Aventis Pasteur	Phase I/II
Vaccins non basés sur l'enveloppe				
Ty p17/p14 VLPs	(LAI)	Levure	British Biotech	Phase I
p24		Cellules CHO	Chiron	Phase I
Tat	(LAI)	Escherichia coli	B. Ensoli, Italy	Phase I
Vaccins basés sur des peptides				
P3C541b	lipopeptide Gag	peptide synthétique	United Biomedical	Phase I
HGP-30	p17 (LAI)	peptide synthétique	Viral Technologies	Phase I/II
V3 loop of gp120	(MN)	peptide synthétique	United Biomedical	Phase I
V3 loop of gp120	(15 souches)	peptide synthétique	United Biomedical	Phase I
gp120 C4-V3	(MN/EV91/RF/CANO)	Polyvalent peptide	Wyeth-Lederle	Phase I
Nef/Gag/V3	Nef/Gag (LAI)/V3 (BX08)	peptide synthétique	Bachem	Phase I
APL 400-003	env/rev (LAI)	vecteur GeneVax®	Wyeth-Lederle	Phase I
APL 400-047	gag/pol (LAI)	vecteur GeneVax®	Wyeth-Lederle	Phase I
VIHA	Multiple épitopes (A)	vecteur pTHr	MRC	Phase I
Vaccins basés sur des virus recombinants				
VIHAc-1e	gp160 (LAI)	Vaccin	Bristol-Myers	Phase I
TCB-3B	Env, Gag, Pol (IIIB)	Vaccin	Therion	Phase I
vCP125	gp160 (MN)	Canarypox (ALVAC)	Aventis Pasteur	Phase I
vCP205	gp120 (MN) et TM gp41 gag et protéase p15 (LAI)	Canarypox (ALVAC)	Aventis Pasteur	Phase I/II
vCP300	gp120 (MN), TM gp41, gag protéase p15 (LAI), nef et pol (LAI)	Canarypox (ALVAC)	Aventis Pasteur	Phase I
vCP1433	gp120 (MN), TM gp41, gag, protéase p15 (LAI), pol et nef (LAI)	Canarypox (ALVAC)	Aventis Pasteur	Phase I
vCP1452	gp120 (MN), TM gp41, gag, pol (protease) (LAI), pol et nef (LAI)	Canarypox (ALVAC)	Aventis Pasteur	Phase I/II
vCP1521 (E/B)	gp120 (92TH023), TM gp41 (LAI), gag/protease p15 (LAI)	Canarypox (ALVAC)	Aventis Pasteur	Phase I/II
MVA-(A)	Polyépitope insert	MVA	A. McMichael	Phase I

Tableau 2 : *Principaux candidats vaccin anti-VIH (essais cliniques). D'après [348]*

Projet de recherches et résultats

Projet de recherche

Les muqueuses constituent la principale voie d'entrée du VIH-1 et l'administration du vaccin au site de pénétration du virus est nécessaire pour l'induction d'une immunité muqueuse protectrice efficace. Les IgA jouent un rôle fondamental dans la réponse immunitaire au sein des muqueuses. Plusieurs travaux ont décrit le rôle important des IgA neutralisantes dirigées contre la région gp41 de l'enveloppe du VIH [342, 347, 349- 350]. Il a été démontré récemment qu'un protocole vaccinal basé sur l'utilisation de virosomes entraîne une immunité protectrice obtenue chez des macaques après une épreuve à l'aide de SHIV par l'induction d'une réponse IgA anti-MPER capable de prévenir l'infection [300]. Les sécrétions comme le lait ou la salive de patients VIH⁺ contiennent des concentrations importantes d'IgA neutralisantes spécifiques de la gp41 [266, 345, 351]. Très récemment, les propriétés neutralisantes de l'anticorps 2F5 dirigé contre la gp41 ont été significativement augmentées grâce à la modification de son isotype IgG en IgA2 [331]. Cependant, les premiers corrélats immunologiques de l'essai clinique THAI RV144 décrivent l'association entre la présence d'IgA anti-V1/V2 monomériques au niveau du sérum des patients vaccinés comme étant liée à un fort risque d'infection [339]. Aucune étude des sécrétions muqueuses n'a été réalisée sur la présence ou l'absence de réponses IgA spécifiques dans ce protocole vaccinal. Enfin, la présence d'IgA muqueuses et systémiques dirigées contre la gp41 a été observée après les premières semaines de la transmission du virus [325]. Pourtant, peu après l'induction, cette production d'IgA anti-gp41 diminue rapidement (de moitié au bout de 2 à 7 jours). Cette baisse semble corrélée avec l'induction d'un pic d'expression du facteur d'activation BAFF des cellules B de la famille du TNF contribuant vraisemblablement à une première réponse anticorps T-indépendante.

Depuis l'apparition de la pandémie du VIH-1, plusieurs groupes d'individus semblent protégés contre une infection par le VIH-1. En effet, chez ces individus, aucune infection par le VIH n'est détectée malgré l'exposition répétée de ces derniers au virus, que ce soit dans le cadre des couples sérodiscordants (un des membres est VIH⁺) ou des prostituées, notamment dans certains pays d'Afrique où la prévalence du VIH est très importante [345, 352]. L'émergence de ces groupes de sujets dits Exposés Séronégatifs (ESN) a suscité beaucoup d'espoir dans la compréhension des mécanismes immunologiques liés à leur protection. Ces individus présentent plusieurs caractéristiques génétiques comme un polymorphisme du CCR5, CCR2 ainsi que du SDF1 ou de la protéine MBL. Ces caractéristiques sont à l'origine des particularités phénotypiques observées chez ces individus et donnent lieu à l'activation de multiples mécanismes immunitaires qui permettent au système immunitaire de traiter le VIH comme un virus banal. Ces particularités génétiques se traduisent donc par des profils d'expression de chimiokines comme l'augmentation de CCL2, CCL4, CCL5 et CCL11 au niveau salivaire chez les ESN lors d'expositions orales répétées [318, 320, 353]. Plusieurs études dont certaines initiées au sein de notre laboratoire ont démontré la présence d'IgA sécrétoires neutralisantes capables de se lier à différents épitopes de la gp16, notamment les épitopes très conservés de la gp120 comme la région V1/V2 ou la région MPER de la gp41 [8-9]. Dans la littérature, de nombreuses études rapportent donc des effets bénéfiques ou néfastes

des IgA anti-VIH-1 suivant le compartiment dans lequel elles sont détectées, l'isotype de ces IgA ainsi que leur structure (monomérique, dimérique ou sécrétoire).

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier la fonction des IgA sécrétoires dirigées contre la partie C-terminale de la gp41 du VIH-1 afin de pouvoir établir l'intérêt potentiel de ces anticorps muqueux. Nous avons choisi d'étudier la réponse dirigée contre la gp41 car peu d'études ciblent cette région de la glycoprotéine d'enveloppe. La variabilité génétique du virus et les modes d'échappement mis en place pour éviter et contourner les vagues de nouveaux anticorps produits par le système immunitaire de l'hôte poussent à une recherche plus fine d'immunogènes conservés, fonctionnels et aisément accessibles à des anticorps neutralisants. Parmi les antigènes répondant à ces critères, se trouvent les glycoprotéines d'enveloppe puisque ce sont les seuls motifs présents à la surface des particules virales qui présentent plusieurs épitopes conservés. Le VIH utilise les glycanes pour masquer les épitopes de la gp120 comme les boucles V1/V2 ou le site de liaison du CD4 [354, 355]. Environ 50% de la surface de la glycoprotéine est recouvert de sucres qui rendent la surface protéique sous-jacente masquée et inaccessible pour le système immunitaire. Le virus est aussi capable de changer l'emplacement de ces glycanes *in vivo* [14, 83]. Ces changements donnent lieu à un bouclier de glycanes mouvant avec des positions de glycosylation en continu repositionnement ce qui permet au VIH d'échapper aux réponses médiées par des anticorps neutralisants spécifiques de la gp120. En plus de ce rôle de bouclier immunitaire, les glycosylations sont aussi une manière de compenser les changements conformationnels de la glycoprotéine d'enveloppe réalisés pour échapper aux anticorps neutralisants. Toutefois, des épitopes conservés sur plusieurs clades sont présents sur la glycoprotéine d'enveloppe au niveau de la gp41. En effet, la Membrane Proximal Ectodomain Region (MPER) est accessible durant les processus d'infection et ne présente pas de masquage par la glycosylation puisqu'il n'y a que 4 sites de glycosylation sur la totalité de la gp41 dont un seul sur la région MPER en position D674 [15].

Durant mon travail de thèse, j'ai étudié dans un premier temps la prévalence des réponses IgA anti-MPER au niveau muqueux dans une cohorte de sujets ESN pour la comparer à celle d'individus HIV⁺ et HIV⁻. Nous avons notamment caractérisé l'activité neutralisante de ces IgA dirigées contre la région MPER. Cette étude préliminaire a permis de démontrer l'intérêt majeur de ces IgA anti-MPER dans l'immunité des ESN notamment grâce à leur capacité à neutraliser le virus *in vitro*.

Nous avons pu confirmer cette prévalence des IgA anti-gp41 au niveau muqueux chez des individus d'une cohorte ANRS du Burkina Faso (AO ANRS 1285 (a et b)). En effet nous avons étudié la présence d'IgA anti-gp41 dans des lavages cervicovaginaux de femmes coinfectées par le VIH et le HSV afin de corréliser cette présence à un rôle protecteur potentiel ou permettant la chute de la charge virale. Nous avons pu observer que 83,3 % des femmes présentant des SIgA anti-gp41 étaient sujettes à une chute de la charge virale dans leur sécrétion cervicovaginale. Ce qui peut suggérer un rôle potentiel de ces anticorps.

Ce travail a donné lieu à une première publication dans AIDS.

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté en la génération *in vivo* d'IgA1 dirigées contre la partie C-terminale de la gp41, afin de les caractériser et étudier leurs propriétés antivirales potentielles. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle murin α 1KI générant des IgA1 humaines chimériques développées par l'équipe de M. COGNE (UMR CNRS 6101 à l'université de Limoges) [356]. L'utilisation de ce modèle murin permet d'obtenir un répertoire diversifié d'anticorps. Ces souris transgéniques humanisées produisent des anticorps à forte affinité et peu immunogènes capables d'être intégrés dans des essais thérapeutiques sur des modèles animaux comme les macaques lors d'administration de SHIV [357-358]. Ces souris ont été immunisées à l'aide d'une lignée cellulaire HEK293gp41^{MSD} développée et validée au sein de notre groupe de recherche. Cette lignée a la particularité d'exprimer à sa surface la gp41 dans sa forme conformationnelle. Les anticorps monoclonaux d'isotype IgA1 chimériques ainsi obtenus ont ensuite été caractérisés pour étudier leur capacité de liaison et leur fonctionnalité antivirale.

Cette seconde partie sera soumise à publication dans PNAS.

Résultats

A. Etude fonctionnelle des SIgA dirigées contre la gp41 dans une cohorte de sujets ESN

Les IgA sécrétoires (SIgA) peuvent protéger l'organisme contre l'infection par le VIH grâce à divers mécanismes, comme la neutralisation directe [5, 6, 314, 326, 359-360], l'inhibition de la transcytose [2, 314, 361-363], la neutralisation des virus intracellulaires [1, 364] ou le blocage de l'entrée du VIH présent dans la lumière épithéliale [190]. Il a été démontré que les SIgA peuvent neutraliser des isolats primaires de VIH-1 chez les patients infectés, mais aussi chez les sujets exposés séronégatifs (ESN) [9, 313, 324, 365-366]. Ces anticorps neutralisants sont dirigés contre les différentes régions-clé à la surface de la gp160 comme le site super antigénique de la gp120 et le site de liaison au CD4 [321, 367-368]. Nous avons déjà montré que la salive parotidienne d'ESN contient des IgA neutralisantes anti-V1/V2. De plus, des SIgA neutralisantes dans les sécrétions cervicovaginales d'ESN ciblant les épitopes QARILAVERY et QARILAV dans la région en super hélice de la gp41, ont été décrites précédemment [5, 326]. Jusqu'à présent, aucune étude n'a décrit le rôle des SIgA muqueuses naturelles anti-MPER chez les patients VIH⁺ et chez des sujets ESN et notamment leur implication dans la protection par neutralisation du VIH. C'est l'objectif de ce premier travail décrit ci-dessous qui est *sous presse dans AIDS (juin 2013)*.

Research Letter

AIDS 2013, 27:000 000

Secretory IgA specific for MPER can protect from HIV-1 infection in vitro

F. Benjelloun^a, R. Dawood^a, S. Urcuqui-Inchima^b, B. Chanut^a, B. Verrier^c, F. Lucht^a, C. Genin^a and S. Paul^a

This preliminary study was performed to assess the neutralization activity of anti-MPER-SIgA from parotid saliva in 88 HIV+ patients, in 5 ESN and in 5 seronegative volunteers. 48.9 % of the HIV+ patients and 100 % of ESN subjects showed anti-gp41 SIgA. 25.6 % of anti-MPER SIgA from HIV+ patients and 100 % from ESN subjects neutralized efficiently HIV-1 primary isolate SF162 (IC 50). The neutralization activity is maintained for much lower concentrations in ESN than in HIV+ secretions.

Antibodies of the IgA class are major components of the immunological defenses present at mucosal surfaces. 90% of sexual transmission of HIV occurs across the mucosa. Secretory IgA (SIgA) can protect the organism against HIV infection by distinct mechanisms such as direct neutralization, [1–6], inhibition of transcytosis [4,7–10], intracellular virus neutralization [11,12] or preventing HIV entry through the epithelial lumen [8]. SIgA have been demonstrated to neutralize primary isolates of HIV-1 in infected patients but also in exposed seronegative (ESN) subjects [13–17]. These neutralizing antibodies are directed against different key regions on the gp160 surface like the superantigenic site on gp120 and the CD4 binding site [18–20]. We have previously shown that parotid saliva from ESN contains neutralizing V1/V2-specific IgA [21,22]. Functional neutralizing SIgA in cervico-vaginal secretions from ESN that target the features QARILAVERY and QARILAV, epitopes within the coiled-coil region of gp41, have been previously described [2,6]. Immunization of macaques with viro-somes containing this peptide leads to protection by producing gp41-specific SIgA in genital secretions [23]. The QARILAVERY and QARILAV patterns correspond to the immunosuppressive epitope on gp41 [24] but this fact is not discussed in terms of the neutralizing effect of the SIgA antibodies directed against them in [2,6]. MPER is a highly conserved region on gp41 protein involved in the early stages of attachment and infection of HIV-1 [25]. This region includes the epitopes of well-described human IgG neutralizing MAbs as 2F5, 4E10, Z13 [26–28] and a recently described antibody, 10E8, which is the broadest and most potent antibody that has been observed so far [29]. The involvement of a specific-MPER SIgA blocking transcytosis by recognition of the neutralizing

epitope ELDKWA have been demonstrated [30]. Until now, few studies have described the role of natural mucosal anti-MPER SIgA in HIV+ patients and in ESN subjects and their involvement in the protection by neutralization of HIV.

Parotid saliva was sampled from 88 HIV+ patients, from 5 ESN subjects (14 women and 79 men) from the Department of Infectious Diseases, University Hospital, Saint-Etienne, France and from 5 HIV- subjects. The purification of SIgA was performed on parotid saliva to avoid contamination by serum antibodies that can be present in total saliva [17,21]. Residual IgG and IgM were depleted from parotid saliva by affinity using Dynabeads® Protein G (Life technologies, Paisley, UK) (data not shown). The SIgA directed to conformational gp41 was detected by immunofluorescence with gp41 transfected HEK 293 cells (HEK 293gp41^{MSD}) [31] (Sup. Fig. S1, <http://links.lww.com/QAD/A283>). This strategy has the advantage to select only SIgA recognizing preferentially conformational and glycosylated epitopes instead of linear epitopes using synthetic peptides [32,33]. 2F5, 3D6 and 4E10 mAb (Polymun Scientific, Vienna, Austria) which bound to HEK 293gp41^{MSD} were used as positive controls. 48.9% (43/88) of the HIV+ patients and 100% (5/5) of the ESN subjects presented SIgA that bound specifically to the transfected cells. From saliva with anti-gp41 SIgA, the MPER-specific SIgA were purified using affinity with magnetic beads (Dynabeads®) engrafted with 6XHistagged MPER peptide (NT⁶⁵⁹ELLELDK-WASLWNWFNITNWLWYIK-6xH⁶⁸³CT, Millegen, Toulouse, France). A control western blot assay was performed to confirm the integrity of the purified SIgA (Sup. Fig. S2, <http://links.lww.com/QAD/A283>). The capacity of total anti-gp41 saliva diluted to 1/100 (SIgA median concentration was 29 ng/ml (7–70) in HIV+ and 45 ng/ml (32–60) in ESN) and of anti-MPER SIgA to inhibit the infection of activated PBMC by a SF162 primary isolate (NIH AIDS Research and Reference Reagent) were tested with a 100 TCID50 dose [16]. The percentage of neutralization was calculated as the reduction of p24 production obtained after infection. Gp41-specific SIgA were neutralizing using IC 50 and IC 80, respectively, in 58.1% (25/43) and in 25.6 % (11/43) of HIV+ patients versus 100% (5/5) and 60% (3/5) of ESN and 0 % (0/5) of HIV- subjects (Fig. 1a). The anti-MPER SIgA were neutralizing in 41.9% (18/43) and 25.6% (11/43) of the HIV+ patients versus 100% (5/5) and 60% (3/5) of ESN and 0 % (0/5) of HIV- (Fig. 1b). After quantification of SIgA in selected saliva by ELISA technique [34], the dose response with serially diluted antibody was studied in 5 HIV+ patients and in the 5

DOI:10.1097/QAD.0b013e3283632ea1

ISSN 0269-9370 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

1

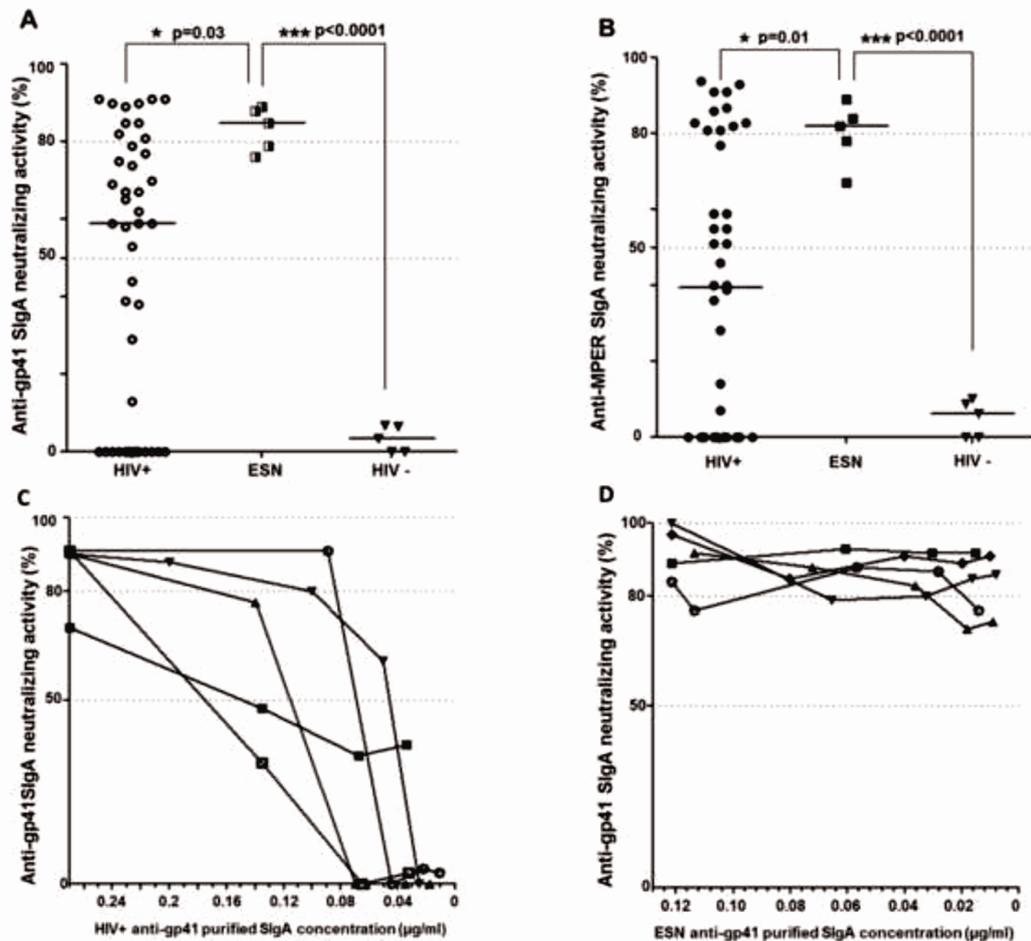


Fig. 1. Neutralization activity of parotid saliva SIgA specific to gp41 and to MPER on SF162 primary HIV-1 isolate (a) Percentage of neutralization activity of anti-gp41 SIgA diluted 1/100 from HIV+ patients, ESN subjects and HIV- subjects. 4E10 was used as positive control. (b) Percentage of neutralization of anti-MPER SIgA diluted 1/100 from HIV+ patients, ESN subjects and HIV- subjects. 4E10 was used as positive control. (c) Percentage of neutralization of anti-gp41 SIgA at decreasing dose in HIV+ patients. (d) Percentage of neutralization of anti-gp41 SIgA at decreasing dose in ESN subjects. Statistics were calculated using a student *t* test.

ESN subjects. The neutralizing activity of anti-gp41 SIgA from the HIV+ patients decreased progressively from 0.24 to 0.04 µg/ml, by contrast, in the ESN, anti-gp41 SIgA values observed were significantly higher than IC50 until the lowest concentration tested (0.02 µg/ml) (Fig. 1c and d).

The MPER segment of the gp41 expressed on the surface of HIV particles plays an important role in the fusion of viral and cellular membranes during infection process with HIV-1 [35,36]. The anti-MPER IgA from the

parotid saliva of ESN subjects has a high neutralization activity even at very low concentrations (pg/ml) while the most neutralizing monoclonal IgGs, directed to MPER, 4E10 and 2F5, neutralized SF162 at 1 and 1.4 µg/ml, respectively, for the IC80 and 720 and 556.4 ng/ml, respectively, for the IC50 (Sup. Fig. S3, <http://links.lww.com/QAD/A283>).

Neutralization assays will need to be performed with other strains to confirm these results but the scarcity of ESN subjects and the low volume of parotid saliva samples

limited this study. Several data showed that the ESN state depends on various factors such as genetic polymorphism in the regulatory region of the CCR5 or CCR2 genes, the intensity of the mannose-binding lectins or of DC-sign expression [37]. The activation of CD8+ lymphocytes and the secretion profile of CC-chemokines in CD4+ lymphocytes can be involved in reducing HIV susceptibility in ESN subjects. Concerning mucosal immunity in ESN subjects, studies are very controversial since the absence [38,39] or the presence of neutralizing SIgA were described [1,10,40] and in some of them, anti-gp41 SIgA was demonstrated [7,23,30]. This preliminary study shows the neutralizing effect of parotid salivary SIgA to MPER in ESN subjects suggesting that they could be associated with protection, even if a more important cohort has to be recruited to gather further data and to confirm our observations. Successful vaccine development will need to stimulate a mucosal immune response and thus the factors that prevent HIV infection in ESN state patients/individuals.

Acknowledgements

We would like to thank all of the saliva donors for making this study possible. We also thank Dr C. Defontaine for supplying human samples. We would like also to thank Dr P. Lawrence for editorial assistance. We thank the NIH AIDS Research and Reagents Program for the HIV-1 isolate and EFS of Saint-Etienne for supplying PBMC. This study was supported by a grant from SIDACTION (France). F.B. was supported by a grant from the Région Rhône-Alpes (France). F.B. performed neutralization with specimens from the cohort and wrote the manuscript. S.U.I., B.V. provided editorial assistance and comments to the manuscript. S.P., C. G. coordinated the work. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

^aGIMAP EA3064, CIC CIE3 Vaccinologie, Faculté de Médecine de Saint Etienne, Université de Lyon, France; ^bGrupo de Inmunovirología-Biogenesis, Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia; and ^cInstitut de Biologie et Chimie des Protéines, FRE 3310 CNRS/UCBL, Lyon, France.

Correspondence to Stéphane Paul, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, EA 3064 Faculté de Médecine de Saint-Etienne, Université de Lyon, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne cedex 02, France.

E-mail: stephane.paul@chu-st-etienne.fr

Received: 4 February 2013; revised: 2 May 2013; accepted: 10 May 2013.

References

- Broliden K, Hinkula J, Devito C, Kiama P, Kimani J, Trabattoni D, et al. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol Lett* 2001; **79**:29–36.
- Clerici M, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, et al. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 2002; **16**:1731–1741.
- Devito C, Hinkula J, Kaul R, Kimani J, Kiama P, Lopalco L, et al. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **30**:413–420.
- Devito C, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *AIDS* 2000; **14**:1917–1920.
- Mazzoli S, Lopalco L, Salvi A, Trabattoni D, Lo Caputo S, Semplici F, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis* 1999; **180**:871–875.
- Pastori C, Barassi C, Piconi S, Longhi R, Villa ML, Siccardi AG, et al. HIV neutralizing IgA in exposed seronegative subjects recognise an epitope within the gp41 coiled-coil pocket. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; **14**:15–21.
- Tudor D, Derrien M, Diomede L, Drillet AS, Houimel M, Moog C, et al. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol* 2009; **2**:412–426.
- Wright A, Lamm ME, Huang YT. Excretion of human immunodeficiency virus type 1 through polarized epithelium by immunoglobulin A. *J Virol* 2008; **82**:11526–11535.
- Hocini H, Belec L, Iscaki S, Garin B, Pillot J, Becquart P, et al. High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; **13**:1179–1185.
- Belec L, Ghys PD, Hocini H, Nkengasong JN, Tranchot-Diallo J, Diallo MO, et al. Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis* 2001; **184**:1412–1422.
- Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, et al. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 1998; **9**:277–287.
- Nguyen M, Pean P, Lopalco L, Nouhin J, Phoung V, Ly N, et al. HIV-specific antibodies but not t-cell responses are associated with protection in seronegative partners of HIV-1-infected individuals in Cambodia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **42**:412–419.
- Kaul R, Plummer F, Clerici M, Bomsel M, Lopalco L, Broliden K. Mucosal IgA in exposed, uninfected subjects: evidence for a role in protection against HIV infection. *AIDS* 2001; **15**:431–432.
- Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999; **13**:23–29.
- Matsuda S, Noda M. Detection of IgA-binding sites on human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoproteins, Gp120 and Gp41. *Microbiol Immunol* 2000; **44**:923–929.
- Vincent N, Malvoisin E, Pozzetto B, Lucht F, Genin C. Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients. *AIDS* 2004; **18**:37–43.
- Moja P, Tranchat C, Tchou I, Pozzetto B, Lucht F, Desgranges C, et al. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediated by parotid IgA of HIV-1-infected patients. *J Infect Dis* 2000; **181**:1607–1613.
- Nishiyama Y, Karle S, Planque S, Taguchi H, Paul S. Antibodies to the superantigenic site of HIV-1 gp120: hydrolytic and binding activities of the light chain subunit. *Mol Immunol* 2007; **44**:2707–2718.

19. Planque SA, Mitsuda Y, Nishiyama Y, Karle S, Boivin S, Salas M, et al. **Antibodies to a Superantigenic Glycoprotein 120 Epitope as the Basis for Developing an HIV Vaccine.** *J Immunol* 2012; **189**:5367–5381.
20. Planque S, Salas M, Mitsuda Y, Sienczyk M, Escobar MA, Mooney JP, et al. **Neutralization of genetically diverse HIV-1 strains by IgA antibodies to the gp120-CD4-binding site from long-term survivors of HIV infection.** *AIDS* 2010; **24**:875–884.
21. Granados-Gonzalez V, Piedrahita LD, Martinez-Gutierrez M, Lawrence P, Saoudin H, Zapata X, et al. **Neutralizing inter-clade cross-reactivity of HIV-1 V1/V2-specific secretory immunoglobulin A in Colombian and French cohorts.** *AIDS* 2009; **23**:2219–2222.
22. Granados-Gonzalez V, Piedrahita LD, Martinez M, Genin C, Riffard S, Urucuqui-Inchima S. **Role of the HIV-1 gp120 V1/V2 domains in the induction of neutralizing antibodies.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**:523–530.
23. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. **Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges.** *Immunity* 2011; **34**:269–280.
24. Denner J, Eschricht M, Lauck M, Semaan M, Schlaermann P, Ryu H, et al. **Modulation of cytokine release and gene expression by the immunosuppressive domain of gp41 of HIV-1.** *PLoS One* 2013; **8**:e55199.
25. Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E, Blumenthal R. **Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion.** *J Virol* 1999; **73**:6089–6092.
26. Ofek G, Tang M, Sambor A, Katinger H, Mascola JR, Wyatt R, et al. **Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope.** *J Virol* 2004; **78**:10724–10737.
27. Zwick MB, Jensen R, Church S, Wang M, Stiegler G, Kunert R, et al. **Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1.** *J Virol* 2005; **79**:1252–1261.
28. Zwick MB, Burton DR. **HIV-1 neutralization: mechanisms and relevance to vaccine design.** *Curr HIV Res* 2007; **5**:608–624.
29. Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. **Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody.** *Nature* 2012; **491**:406–412.
30. Alfsen A, Iniguez P, Bouguyon E, Bomsel M. **Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1.** *J Immunol* 2001; **166**:6257–6265.
31. Dawood R, Benjelloun F, Pin JJ, Kone A, Chanut B, Jospin F, et al. **Generation of HIV-1 potent and broad neutralizing antibodies by immunization with postfusion HR1/HR2 complex.** *AIDS* 2013; **27**:717–730.
32. Mantis NJ, Rol N, Corthesy B. **Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut.** *Mucosal Immunol* 2011; **4**:603–611.
33. Paul A, Antony M, Mathai J, Appukkuttan PS. **High polymeric IgA content facilitates recognition of microbial polysaccharide-natural serum antibody immune complexes by immobilized human galectin-1.** *Immunol Lett* 2011; **136**:55–60.
34. Vincent N, Kone A, Chanut B, Lucht F, Genin C, Malvoisin E. **Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates.** *AIDS* 2008; **22**:2075–2085.
35. Salzwedel K, West JT, Hunter E. **A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity.** *J Virol* 1999; **73**:2469–2480.
36. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. **Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.** *Cell* 1997; **89**:263–273.
37. Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F, Lo Caputo S, Veas F, Clerici M, et al. **The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals.** *AIDS* 2009; **23**:161–175.
38. Dorrell L, Hessel AJ, Wang M, Whittle H, Sabally S, Rowland-Jones S, et al. **Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia.** *AIDS* 2000; **14**:1117–1122.
39. Mestecky J, Wright PF, Lopalco L, Staats HF, Kozlowski PA, Moldoveanu Z, et al. **Scarcity or absence of humoral immune responses in the plasma and cervicovaginal lavage fluids of heavily HIV-1-exposed but persistently seronegative women.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; **27**:469–486.
40. Choi RY, Levinson P, Guthrie BL, Lohman-Payne B, Bosire R, Liu AY, et al. **Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples.** *AIDS* 2012; **26**:2155–2163.

Lors de cette étude nous avons recherché le rôle protecteur des SIgA anti-gp41 issues de salives parotidiennes provenant d'individus ESN. Nous avons, dans un premier temps, sélectionné les individus selon la capacité de leurs SIgA salivaires à reconnaître la gp41 conformationnelle. Nous avons utilisé la lignée HEK293gp41^{MSD} développée dans notre laboratoire afin d'évaluer l'immunoréactivité de ces salives par immunofluorescence. Nous avons pu constater que 100% des sujets ESN étudiés présentent des SIgA capables de se lier spécifiquement à la gp41 dans cette configuration contre 43% chez des patients HIV⁺. Aucun patient séronégatif ne présente de reconnaissance de cette lignée cellulaire (cf. Figure supplémentaire S1)

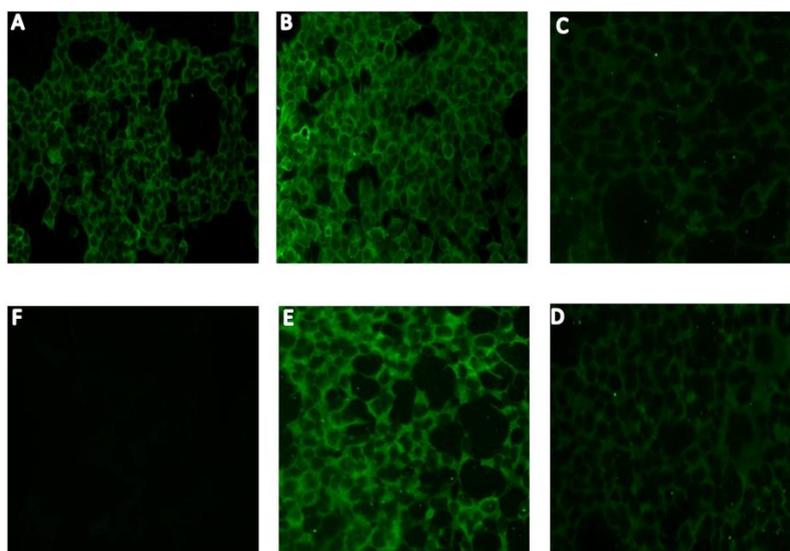


Figure S1 : Screening de différentes fractions de SIgA (500 ng) sur la lignée HEK 293gp41^{MSD} par microscopie à fluorescence. 2F5 (A) and 3D6 (B) ont été utilisés comme contrôles positifs et révélés par un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG humaine couplé à la FITC (Paris-biotech, Compiègne, France). L'immunoréactivité des SIgA totales purifiées des patients HIV⁺ (C, D), ESN (E) ou séronégatifs (F) est testée et révélée par un anticorps de lapin polyclonal anti-IgA humaine couplé à la FITC (Paris-biotech). Les SIgA des HIV⁺ et ESN se lient spécifiquement au HEK 293gp41^{MSD}. Aucun bruit de fond n'a été observé avec les salives HIV⁻.

Afin de limiter les pertes d'IgA durant les étapes de purification, nous avons réalisé un tri négatif en déplaçant totalement les IgG grâce à des billes magnétiques recouvertes de protéine G. Les anticorps dirigés contre l'épitope MPER ont été purifiés en incubant les fractions d'IgA totales avec des billes magnétiques recouvertes de MPER (séquence 6Xhis). Le rendement de cette technique de purification est optimal puisqu'aucune IgA anti-MPER n'est récupérée après une deuxième incubation des fractions de lavage. La structure de l'antigène gp41 pour la sélection des SIgA pourrait être améliorée en greffant des molécules plus complexes et conformationnelles comme les membranes de cellules HEK293gp41^{MSD} sur des supports hydrophobes afin de purifier ces SIgA par SPR. L'intégrité des SIgA anti-MPER purifiées a été vérifiée par Western-blot en conditions dénaturantes mais non réduites (cf. Figure supplémentaire 2).

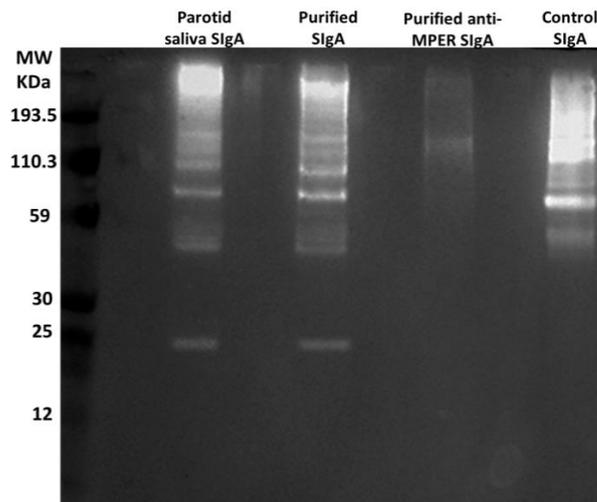


FIG S2: Les salives parotidiennes totales, les SlgA totales et les SlgA anti-MPER ont été vérifiées par western-blot. H7 qui est une IgA monoclonale anti-gp41 a été utilisée comme contrôle positif. Les fractions ont été chauffées en NuPAGE® LDS (Lithium dodecyl sulfate) mais pas réduites. La séparation a été réalisée sur gel NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris Gel (Life technologies). Les anticorps ont été révélés par un des anticorps polyclonaux anti-chaîne lourdes et anti-chaîne légères humaines couplés à la HRP. L'intégrité des SlgA présentes dans les différentes fractions a été confirmée. On observe pour la salive parotidienne et les SlgA totales des bandes à 25kDa correspondant aux chaînes légères, les bandes à 70kDa correspondant aux chaînes lourdes, les molécules de SlgA apparaissent à 170kDa. Concernant la fraction des SlgA anti-MPER, on n'observe que la bande correspondante à la molécule complète.

Nous avons pu constater que les IgA anti-MPER des sujets ESN présentent des capacités neutralisantes très fortes sur l'isolat primaire SF162 et même à de très faibles concentrations d'anticorps (de l'ordre du pg/ml). Ces résultats concordent avec les données obtenues dans différentes études décrivant l'effet neutralisant des IgA dans le compartiment muqueux. Une forte activité neutralisante des SlgA a été observée chez 58% des patients HIV⁺ mais aucune corrélation clinique n'a pu être observée. En effet, des paramètres comme le sexe, la durée d'infection, la charge virale, le taux de lymphocytes T CD4⁺, les co-infections ou les traitements suivis ont été analysés à l'aide de tests statistiques multiparamétriques chez ces patients. Ces résultats doivent être confirmés par des tests de neutralisation sur différentes souches virales. L'étude d'une cohorte ESN plus importante doit également être réalisée. La rareté des ESN et les faibles volumes d'échantillon de salives ont limité notre étude. Il paraît également crucial d'étudier la prévalence de ces anticorps dans d'autres sécrétions muqueuses comme les lavages cervico-vaginaux et le sperme de sujets ESN.

L'ADCC (Cytotoxicité à Médiation Cellulaire Dépendant des Anticorps) et L'ADCVI (L'Inhibition Virale à médiation Cellulaire Dépendant des Anticorps) sont deux mécanismes qui relient l'immunité innée et adaptative. Elles impliquent des cellules effectrices notamment des NK capables de médier la lyse cellulaire. En effet l'interaction du domaine Fc des anticorps avec le récepteur FcγR à la surface des cellules va déclencher une série d'événements qui conduisent à la destruction de la

cellule infectée via des granules cytotoxiques (perforine, granzyme) ou une voie de mort dépendant du récepteur Fas / FasLigand ou TNF / TNFR. Cependant l'ADCVI n'est pas limitée à la lyse des cellules cibles, comme pour l'ADCC. Elle englobe plutôt plusieurs mécanismes capables d'inhiber la réplication du virus. Toutefois, malgré le rôle crucial de ces mécanismes, les épitopes capables de les activer sont peu connus [333, 369]. Il a été démontré que des macaques immunisés par l'enveloppe présentaient des cellules B mémoire capables de produire au niveau muqueux des IgA pouvant induire l'ADCVI ainsi que l'inhibition de la transcytose [310]. Lors de cette étude, les premières IgA produites étaient dirigées contre la gp41 et non contre la gp120. Il serait très intéressant de pouvoir étudier les fonctions ADCC et ADCVI *in vitro*. L'activité d'inhibition de la transcytose peut être aussi étudiée *in vitro* en adaptant un modèle épithélial en monocouche déjà développé au sein de notre laboratoire. Ce modèle permettra d'investiguer la capacité de ces SIgA à inhiber le passage des cellules infectées et ou des particules virales du pôle apical vers le pôle basal. Afin de différencier les réponses humorales selon le compartiment immunitaire, il paraît intéressant de pouvoir étudier les IgA produites dans l'organisme au niveau muqueux comme dans le lait, les lavages cervicovaginaux ainsi que dans le sérum. Il serait particulièrement intéressant de différencier les allotypes de SIgA (SIgA1 et SIgA2) ainsi que la structure de la SIgA (monomérique, dimérique ou sécrétoire) pour l'étude de chaque fonction dans les différentes sécrétions. Cette distinction entre les réponses systémique et muqueuse pourra nous indiquer la nature de cette protection s'il s'agit d'IgA induites localement à la suite d'une exposition muqueuse répétée ou à une protection au sein des deux compartiments immunitaires comme décrit dans la littérature chez les ESN [5].

Parmi les patients étudiés dans notre étude, deux présentaient un profil de Long Term Non Progressor (LTNP). Les LTNP sont des patients qui, malgré une infection chronique par le VIH et sans traitement antirétroviral, présentent un taux de lymphocytes T CD4⁺ normal ainsi qu'une charge virale indétectable sur plusieurs années. La salive parotidienne de ces deux patients contient des SIgA anti-gp41. Les SIgA purifiées présentaient une activité neutralisante parmi les plus importantes, ce qui classe ces individus parmi les « Elite » neutraliseurs de notre cohorte. Il serait donc particulièrement intéressant de rechercher ces SIgA anti-gp41 dans une cohorte de LTNP afin de pouvoir discuter d'un possible corrélat de protection lié à la présence de ces anticorps.

Enfin, il paraît être nécessaire de pouvoir étudier de manière plus large la reconnaissance des SIgA vis-à-vis d'une librairie plus large d'antigènes comme des formes délétées de MPER ou présentés à la surface de virosomes. Les études de Walker et al. [234] ont permis, en alliant différentes technologies lors des tests de neutralisation ainsi que les séquençages, de générer et de caractériser des anticorps monoclonaux comme le PG9 et le PG16 ainsi que d'autres familles d'anticorps comme les HAADs dont le pouvoir de neutralisation est très large et capables de neutraliser *in vitro*, jusqu'à 80% des souches VIH circulantes à travers le monde. Cette étude peut être une perspective intéressante pour notre projet. Nous avons démarré au laboratoire des études visant à sous-cloner le répertoire de cellules B

mémoire circulantes chez différents individus (ESN, LTNP et primo-infectés) en collaboration avec la société Dendritics. Nous espérons pouvoir isoler des plasmocytes à IgA (voir à IgM) d'intérêt. Plusieurs données ont montré que l'état d'ESN dépend de divers facteurs tels que le polymorphisme génétique dans la région régulatrice des gènes CCR5 ou CCR2, l'intensité des lectines liant le mannose ou d'expression de DC-SIGN [318]. L'activation des lymphocytes CD8⁺ et le profil sécrétoire de chémokines-CC dans les lymphocytes CD4⁺ peuvent être impliqués dans la réduction de la virulence du VIH chez les sujets ESN. Le rôle protecteur des SIgA chez les sujets ESN, reste très controversé. En effet des études rapportent l'absence [351, 370] ou la présence de SIgA neutralisantes [345, 359, 363]. Certaines d'entre elles sont des IgA anti-gp41 [2, 300, 350]. Cette étude préliminaire confirme l'effet neutralisant des SIgA salivaires parotidiennes chez les ESN, suggérant qu'ils pourraient être associés à la protection. Nous souhaitons également étudier de façon similaire le rôle protecteur d'autres anticorps muqueux, les SIgM.

En parallèle à ce travail, nous avons eu la possibilité de rechercher ces SIgA anti-gp41 dans le cadre d'une étude ANRS en collaboration avec l'équipe de Ph Van de peere à Montpellier. Cette étude portait sur la prévalence des IgA anti-gp41 au niveau vaginal dans une cohorte de femmes burkinabées (AO ANRS 1285 (a et b)). Nous avons étudié la présence d'IgA anti-gp41 dans les lavages cervicovaginaux de femmes coinfectedes par le VIH et le virus HSV afin de corréliser cette présence à un rôle protecteur potentiel et/ou permettant la dissémination virale. Les résultats préliminaires de cette étude ont démontré que sur les 30 échantillons testés, 20% d'entre eux présentaient des IgA capables de reconnaître spécifiquement la lignée cellulaire HEK293gp41^{MSD} par immunofluorescence. Aucun de ces échantillons ne présentait de reconnaissance de la gp120. Parmi les patients présentant des SIgA anti-gp41, 33% présentaient au moins 2 disséminations virales durant leur suivi biologique. Cependant, seul 3% des patients qui ne présentaient pas de dissémination virale avait des anticorps SIgA anti-gp41. Cette étude préliminaire confirme la prévalence de ces SIgA anti-gp41 et semble indiquer un potentiel rôle fonctionnel de ces anticorps. Cette étude va être complétée sur une cohorte plus importante. Cette étude pourrait permettre de démontrer que les SIgA présentes dans les sécrétions protègent localement contre de multiples infections.

Durant cette première partie, nous avons démontré l'intérêt des SIgA dirigées contre la gp41. Nos travaux préliminaires semblent indiquer un rôle potentiellement protecteur de ces anticorps. Cependant, ces anticorps arrivent sans doute trop tardivement au cours de la primo-infection et ne peuvent donc pas participer à la protection contre l'infection. Il paraît donc important d'essayer de les produire *in vitro* afin de pouvoir les utiliser comme agent thérapeutique afin de limiter la prolifération du virus. Il paraît également crucial de définir précisément les épitopes reconnus par ces anticorps afin de pouvoir essayer de les induire dans une stratégie vaccinale prophylactique anti-VIH.

B. Développement d'IgA humanisées dirigées contre la gp41

Ces travaux vont être soumis à PNAS.

Nous avons pu démontrer dans la première partie de mon travail de thèse, les propriétés neutralisantes et potentiellement protectrices des SIgA dirigées contre la gp41. De plus, les études de Bomsel *et al* sur le peptide P1 de la gp41 indiquent que les IgA dirigées contre ce peptide peuvent conférer une protection chez des macaques après l'administration vaginale de SHIV. L'immunogénicité de cette approche a été démontrée au cours d'une phase I [300, 347]. D'autres études ont démontré la présence d'IgA systémiques et muqueuses chez des macaques immunisés par l'enveloppe du SIV et du VIH. Les premiers anticorps produits lors de ces immunisations présentaient une spécificité vis-à-vis de la gp41 uniquement et avaient différentes propriétés fonctionnelles de type ADCC et ADCVI anti-VIH ainsi que la capacité de bloquer l'inhibition de la transcytose *in vitro* [310]. La partie C-terminale de la gp41 abrite plusieurs épitopes très importants comme la région MPER, l'épitope de Kennedy ainsi que le complexe de fusion [88]. MPER est une région hautement conservée de la gp41 qui est impliquée dans les premières étapes de l'attachement et de l'infection par le VIH. Cette région comprend les épitopes d'IgG humaines neutralisantes comme la séquence ELDKWA pour l'anticorps 2F5, WF (N/D) pour 4E10, Z13 [110, 371] et un anticorps neutralisant à large spectre récemment décrit le 10E8 [109]. La plupart des AcMNL décrits pour neutraliser le VIH sont des IgG. Peu d'études décrivent le rôle des SIgA anti-MPER et leur implication dans la protection et/ou la neutralisation du VIH au niveau muqueux. Au sein de notre équipe, différents travaux ont permis de décrire les réponses IgA dirigées contre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 dans la salive parotidienne et le sérum de patients VIH⁺ et de sujets ESN [8-9, 301]. La difficulté lors de l'étude des réponses muqueuses chez les ESN et les VIH⁺ est de pouvoir disposer d'une quantité d'anticorps suffisante pour pouvoir réaliser les différents types de test de caractérisation. Les échantillons de salives et de lavages cervicovaginaux sont en faibles quantités et peu concentrés en immunoglobulines ce qui limite l'exploration des SIgA. Il paraît donc nécessaire de pouvoir produire ces anticorps *in vitro* en générant des hybridomes après immortalisation de lymphocytes B. Ces lymphocytes peuvent être d'origine humaine ou animale mais cette approche est limitée par la rareté et la difficulté d'obtenir des lymphocytes B muqueux notamment chez l'homme. En effet, aucune étude à ce jour n'a permis de décrire l'obtention de plasmocytes des muqueuses à partir de biopsie humaine.

A ce jour, aucune IgA anti-VIH n'a pu être produite à partir d'un hybridome aussi bien chez l'homme que chez la souris. Afin de limiter l'immunogénicité de ces anticorps, nous avons utilisé le modèle murin $\alpha 1$ kl humanisé permettant de produire des IgA1 chimériques humaines. Ce modèle de souris a été développé par l'équipe de M. Cogné à Limoges. La forme chimérique consiste à insérer un gène constant humain $\gamma 1$ ou $\alpha 1$ en aval des clusters V, D et JH du locus IgH de la souris. Ces animaux permettent d'obtenir après fusion, des hybridomes spécifiques de l'immunogène, permettant, dès le stade des hybridomes initiaux, les tests fonctionnels propres à l'isotype souhaité [356]. Ces souris transgéniques humanisées constituent un outil

très performant permettant la production d'un nombre important d'anticorps de forte affinité et spécificité ainsi que de faible immunogénicité [357-358]. Ce modèle est une alternative de choix aux hybridomes dérivés de sang humain qui n'ont jamais démontré leur capacité à produire un hybridome IgA anti-VIH humain.

Une première étude a été réalisée au sein de notre équipe sur les souris $\alpha 1\text{KI}$. L'immunisation de ces souris a permis la production d'une IgA dirigée contre le site de clivage de la gp41 et de la gp120 après immunisation avec une protéine de fusion MBP comprenant une partie de la gp120 et de la gp41. Cette IgA reconnaît un épitope linéaire et possède la capacité de neutraliser *in vitro* différentes souches de laboratoire et primaires du VIH-1. Le caractère neutralisant de cette IgA obtenue à la suite d'une immunisation à l'aide d'une protéine non glycosylée (car produite chez *E. coli*), nous a poussé à améliorer notre stratégie d'immunisation. Lors de mon travail de thèse, nous avons choisi d'immuniser ces souris avec la lignée HEK293gp41^{MSD} afin de générer des IgA fortement neutralisantes car ciblant des épitopes conformationnels localisés dans la gp41.

MPER-specific broadly neutralizing monoclonal IgA derived from humanized mice.

Benjelloun F¹., Oruc Z²., Thielens N^{3,4,5}., Morris L⁶., Verrier B⁷., Champier G⁸., Rochereau, N¹., Jospin F¹., Chanut B¹., Cogné M²., Genin C¹. and Paul S¹.

¹GIMAP/EA3064, INSERM CIE3 Vaccinology, Université de Lyon, 42023 Saint-Etienne, France; ² Université de Limoges, CNRS UMR 7276, Limoges, France; ³CEA, DSV, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, F-38027, France. ⁴CNRS, UMR 5075, 41 rue Jules Horowitz, Grenoble F-38027, France. ⁵Université de Grenoble Alpes, F-38000, France. ⁶National Institute for Communicable Diseases, Johannesburg, Private Bag X4, Sandringham 2131, Johannesburg, South Africa. ⁷Institut de Biologie et Chimie des Protéines, FRE3310/CNRS, Université de Lyon, F69007, France;

Corresponding author: Dr. Stéphane PAUL
Faculté de médecine - GIMAP EA3064
42023 Saint-Etienne (France)
E-mail: stephane.paul@chu-st-etienne.fr

Abstract: The presence of IgA that can neutralize HIV-1 *in vitro* has been described at the systemic and mucosal levels of HIV-1 infected patients. Recent studies have shown that some individuals who are highly exposed to HIV-1 but persistently HIV-1 seronegative have mucosal IgA HIV-1-specific antibodies that are able to neutralize HIV and block the transcytosis. SIgA are involved in different types of mechanisms such as immune exclusion, neutralization, ADCC, viral aggregation and induction of cellular response. That suggests that antibodies of IgA isotype have the potential to neutralize mucosal transmission what represents the majority of cases of HIV infection. In serum and saliva, the anti-HIV IgA response is predominantly against the envelope protein of HIV-1. In this study, humanized α K1 mice producing chimeric IgA were immunized with a gp41 transfected cell line HEK-293gp41^{MSD}. IgA-producing clones were derived and immortalized to characterize the functionality of newly generated antibodies. This strategy allows us to describe new monoclonal IgA antibodies specific of the MPER gp41 region with strong neutralizing activities *in vitro*.

Keywords: humanized mice, IgA, gp41, MPER, neutralizing antibodies, HIV

Introduction

In order to prevent HIV-1 infection, an effective vaccine should induce both humoral and cellular immune responses at the mucosal and systemic compartments. A protective immunity at the mucosal surface, the major entry site for HIV (2), involves IgA and IgG that can trigger different and somewhat complementary immune mechanisms (3). Worldwide, approximately 90% of sexual transmission of HIV occurs across the mucosa. IgA antibodies are the major mediators of immunological defenses at mucosal surfaces. Indeed, studies on the role of mucosal env-specific SIgA present in genital fluids from infected women highlight their ability to neutralize *in vitro* HIV primary isolates and mediate inhibition of HIV transcytosis across epithelial cells (4-6). This neutralizing property has also been demonstrated for the systemic and mucosal IgA in HIV-1 + and ESN individuals (1, 7), but the magnitude and frequency of HIV-specific SIgA seems to be very low during chronic infection (8). Among the neutralizing antibodies described in mucosal compartment are IgA directed to the envelope and target key regions on gp160 like the CD4 binding site, the super antigenic epitope (1, 7, 9-11) and V1V2 variable loops (12, 13) on gp120. Epitopes present on gp41 are also targeted by protective mucosal neutralizing IgA and have been described in exposed seronegative (ESN) individuals (14-16) like the characteristic QARILAVERY, Kennedy epitope or MPER (Membrane Proximal Ectodomain Region) (5, 17-19). MPER is a highly conserved region on gp41 involved during the early stages of

attachment and infection of HIV (20). This region comprises the epitopes of well described human IgG monoclonal broadly neutralizing Antibodies (mbNAbs) as ELDKWA for 2F5, WF (N/D) IT for 4E10, Z13(21-23) and 10E8 which is a recently described antibody with the broadest and most potent neutralizing properties directed against MPER thus far observed (24). Furthermore, most of mbNAbs described to neutralize HIV are from the IgG isotype (25, 26). To date, only very few studies described the role of broadly neutralizing anti-MPER IgA and their involvement in the protection and / or neutralization of HIV (27, 28) during experimental anti-HIV vaccine trials. The role of mucosal protective neutralizing IgA against mucosal transmission of HIV is unclear and controversial (8).

The aim of our study was to elicit new IgA neutralizing antibodies that target the C-terminal neutralizing epitopes on gp41. To improve the immunogenicity of our antigen, the HEK 293gp41^{MSD} cell line which allows the expression of a transmembrane conformationally folded gp41 has been used for immunization (29). Transfected cells were injected in humanized chimeric mice α 1K1 to produce gp41-specific humanized chimeric IgA1 (30). We herein describe the use of this mouse model to generate potent neutralizing IgA antibodies against HIV. High-affinity antibodies were generated and produced as monoclonal after immortalizing and selecting specific antibody-producing cells through hybridoma derivation (31). Immunization in mice was very efficient and allowed the generation of 13 gp41-specific B-cell clones. From these

clones, 6 antibodies presented great recognition ability of gp41 and potent neutralization activity *in vitro* against both HIV-1 laboratory adapted virus and primary isolates from different clades. Among these antibodies, one IgA1 (F4.30) stands out with its neutralizing potency against different HIV-1 strains. This antibody recognizes a large epitope which overlaps the highly conserved epitope of 4E10 on gp41 and presents low rates of autoreactivity unlike the previously described MPER-specific antibodies (32).

Results

To induce gp41-specific neutralizing antibody, immunization of humanized transgenic mice was performed using the potent conformational immunogen HEK293gp41^{MSD} human cell line that allowed the native shape expression of a natural conformational membrane gp41 as present in viral particles (29).

Production of gp-41 specific chimeric IgA1 B cell clones

The HEK293-gp41^{MSD} (29) cells were used to immunize α 1KI mice (30, 33) as described in the method section. Immunizations were made by a priming hydrodynamic transfection with naked DNA (pdisplay-HR1-PID-HR2), and boosts with emulsions of intact HEK293-gp41^{MSD} cells in presence of Freund's adjuvant to optimize antigen presentation. Sera from immunized mice were shown to exhibit specific binding to HEK 293-gp41^{MSD} cells and not to untransfected cells. After immunizations, more than 2300 hybridoma B cell clones

were isolated and immortalized. Supernatants of individual B cell clones were all tested by immunofluorescence on HEK293-gp41^{MSD} and on untransfected cells. Among the hybridomas, only 13 clones present highly specific recognition on HEK293-gp41^{MSD} cell line and not untransfected cells (figure 1 A-H). Those candidates were amplified. Supernatants were collected to purify recombinant monoclonal IgA1 as described in the method section. Briefly, IgA1 were first concentrated and then purified on peptide M column as described in the method section. The production rate was quantified by specific IgA ELISA assay. The average concentration of IgA1 was of 196 ng/ μ l with a range between 86ng/ μ l and 295ng/ μ l.

Epitope mapping of purified gp41-specific IgA1

To confirm the specificity of the different purified IgA1, immunofluorescence on HEK 293-gp41^{MSD} was performed. Only clones with high recognition of HEK 293-gp41^{MSD} and not untransfected cells were selected (Figure 1 A-H). The clones presenting weak recognition (Figure 1F) were not selected. This first screening allowed us to select 6 very interesting clones (F4.5, F4.6, F4.30, C6.11, C6.13, and SC16C13).

Then, the binding of purified IgA1 to peptide epitopes of the Env glycoprotein (clade B) and to recombinant gp41 or gp140 were tested by specific ELISA (Table 1). By using a 15-mer peptide library, we showed that the specificity of the clones was directed to the MPER and to the HR2 regions of gp41. Only F4.6 clone recognizes the N-terminal

region of the immunosuppressive domain QARILAV (Table 1). The 6 IgA1 recognized the neutralizing epitope of 2F5 present on MPER. F4.6 and C6.13 bound to an extended epitope that encompasses that of 2F5. F4.5 binds to

the peptide that represents the region upstream of the 2F5 epitope, and weakly to the ASLW motif which is downstream of the ELDKW. C6.13 recognizes a larger region upstream of ELDKWA corresponding to the HR2

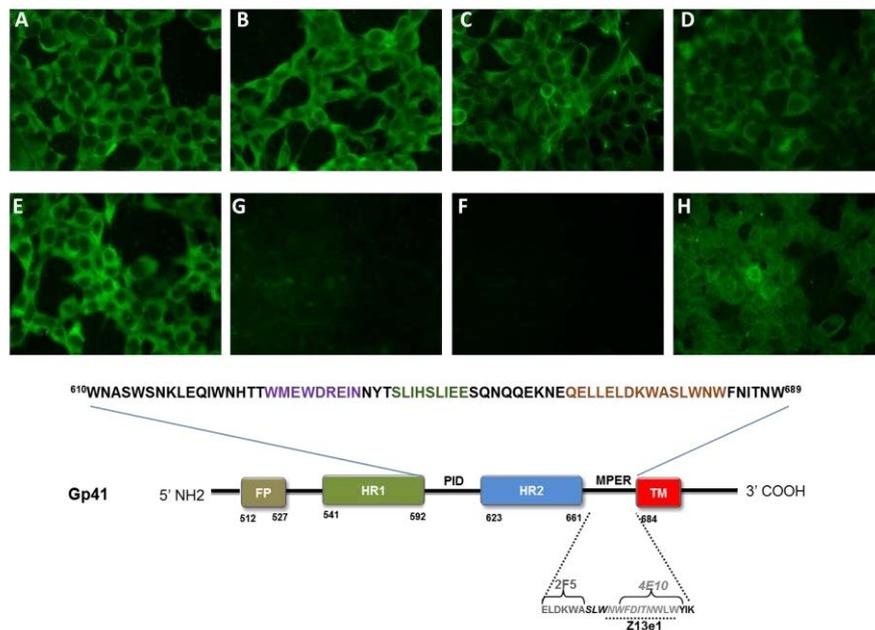


Figure 1: Immunofluorescence of principal IgA clones on HEK 293gp41MSD transfected cells (A-H). Immunoreactivity of purified IgA anti-gp41 (500 ng) are revealed by a rabbit polyclonal anti-human IgA labeled FITC (A-E). Anti-gp41 Mab 3D6 were used as positive controls and revealed with a rabbit polyclonal anti-human IgG labeled FITC (H). (F). Anti-gp41 IgA bind specifically to HEK 293gp41MSD transfected cells and no background was observed with IgA G. (I) Schematic representation of gp41 and different subregion that compound it, the highlighted sequences correspond to the region recognized by all the anti-gp41 IgA. The 3 coloured amino acid sequences are the epitopes recognized by ELISA assay of table 2. FP: Fusion peptide, MPER: Membrane Proximal Ectodomain Region. C-, N-HR: C- N- Heptad repeat region, TM: transmembrane region Cf (Table1)

HXB2B CON CEN SUS 15-mer peptides env									
peptide n°	amino acid sequence	gp41 region	F4.30	c6.11	F4.5	C6.13	SC6C13	F4.6	IgA 2F5
8912	KLICTTTVPWNASWS		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
8913	TTTVPWNASWSNKSL		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
8914	PWNASWSNKSLDEIW		1,40	nb	nb	0,60	nb	1,54	nb
8915	SWSNKSLDEIWDNMT		nb	nb	nb	0,96	nb	nb	nb
8916	KSLDEIWDNMTWMEW	HR2	1,49	nb	0,61	2,73	nb	2,52	nb
8917	EIWDNMTWMEWEREI		1,16	0,62	1,04	0,72	nb	1,24	nb
8918	NMTWMEWEREIDNYT		nb	0,62	nb	0,87	0,42	0,93	nb
8919	MEWEREIDNYTSLIY		1,18	0,51	0,71	2,41	0,60	2,17	nb
8920	REIDNYTSLIYTLIE		3,18	2,02	2,59	3,30	nb	3,18	nb
8921	NYTSLIYTLIEESQN		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
8922	LIYTLIEESQNQQEK		nb	nb	nb	2,29	nb	nb	nb
8923	LIEESQNQQEKNEQE		nb	nb	nb	0,95	nb	0,67	nb
8924	SQNQQEKNEQEELLE		nb	nb	nb	nb	nb	0,67	nb
8925	QEKNEQEELDKWA		nb	0,86	nb	1,22	1,22	0,65	3,69
8926	EQELLELDKWASLWN		1,01	0,80	0,76	1,72	1,01	0,97	3,79
8927	LELDKWASLWNWFDI	MPER	0,62	nb	nb	1,02	1,21	1,10	0,69
8928	KWASLWNWFDITNWL		nb	0,74	nb	0,75	nb	0,65	nb
8929	LWNWFDITNWLWYK		nb	1,74	0,60	nb	nb	nb	nb
8930	FDITNWLWYKIFIM		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
8931	NWLWYKIFIMIVGG		nb	nb	nb	nb	nb	nb	
8932	YKIFIMIVGGIIGL		nb	nb	nb	nb	nb	nb	
8933	FIMIVGGIIGLRIVF		nb	nb	nb	nb	nb	nb	
8934	VGGIIGLRIVFAVLS	TM	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
8935	IIGLRIVFAVLSIVNR		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
HEMAGLUTININ A			nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
GP41 HXB2			3,93	3,46	4,23	2,54	1,20	2,30	1,55
GP140 strain 97/C/N/54			0,56	0,62	0,68	0,54	0,68	0,56	1,49

Table 1: Epitope mapping by ELISA of gp41-specific IgA using an HXB2 consensus envelope 15-mer peptides library. Recombinant gp140 and GP41 were also tested. HA was used as negative control. Optical density values were all corrected for nonspecific binding in blank controls nb: no binding. The 2F5 IgA were used as positive control for the recognition of gp41 and MPER epitope. Values represent mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicate.

F4.6 seems to bind more specifically to the HR2 than the MPER region. C6.11 and C6.13 recognized the 2 neutralizing epitopes on MPER (ELDKWA and WFD/NIT). F4.30 recognizes the ELDKW motif and the HR2 region. All the recombinant IgA1 are able to strongly recognize both the gp41 ectodomain produced in *E.coli* and more weakly purified recombinant gp140 produced in CHO cells (Table 1).

Measure of the affinity of anti-MPER IgA1 by Surface Plasmon Resonance (SPR)

To compare the different IgA1 clones and to assess their ability to recognize the gp41 glycoprotein, affinities of the IgA were measured using Surface Plasmon Resonance. Kinetic

experiments were performed using different targets on the chip as the gp41 ectodomain (clade B, *E.coli*), gp140 (clade C, CHO cells) and a gp120gp41 hybrid protein that includes the C-terminal region of gp120 and the extra membrane region of gp41 (clade B, *E.coli*). Target proteins were immobilized, and the MPER specific IgA and well defined anti-MPER antibodies at various concentrations (0.5-640 nM) were used as analytes (figure 2). Except C6.11, all the IgA recognized and presented a high affinity for gp120c41. Indeed, SC16C13 presented the strongest affinity to gp120c41 with a K_D of 0.34nM while F4.30 presented the weakest affinity to this protein with a K_D of 12 nM while the K_D of 4E10 and 3D6

is about 0.34 and 10.4 nM, respectively (cf. figure 2F and S1).

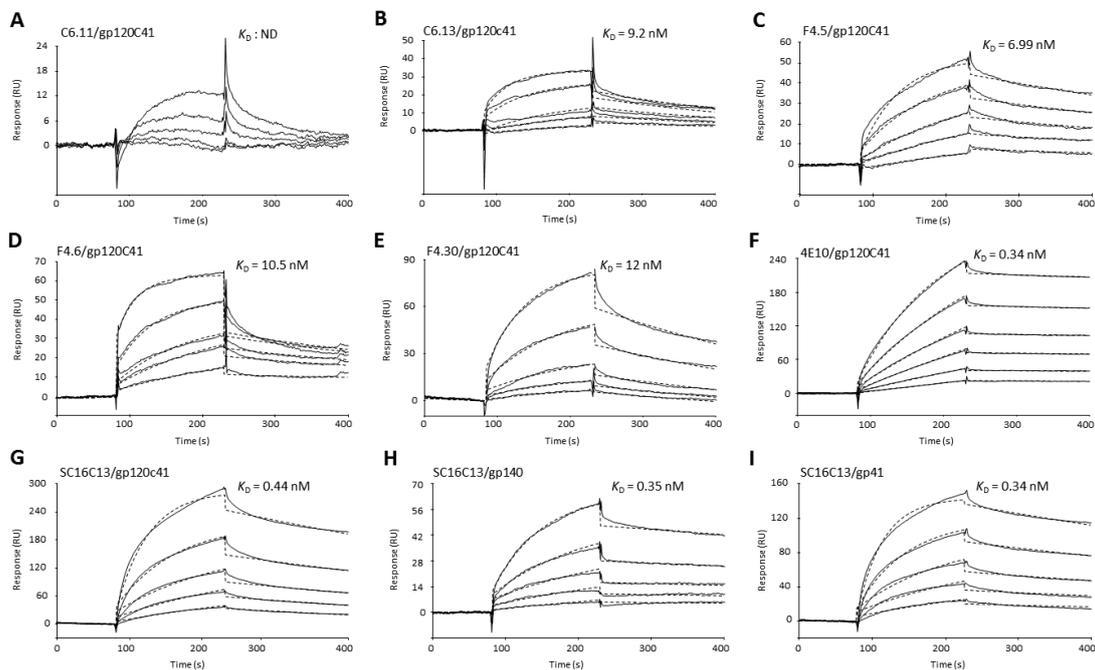


Figure 2: Kinetic analyses of the interaction of the MPRE-specific purified IgA with recombinant envelope glycoproteins. (A-F) C6.11 (5-80 nM), C6.13 (5-80 nM), F4.5 (5-80 nM), F4.6 (10-160 nM), 4E10 (0.5-16 nM) and SC16C13 (0.5-8 nM) were injected over 8200 RU of immobilized gp120C41 in PBS containing 0.005% surfactant P20. (G-H) SC16C13 (0.5-8 nM) was injected over 7500 RU of immobilized gp140 (G) and 1000 RU of immobilized gp41 (H). The binding signals shown were obtained by double referencing (subtraction of the reference surface and of buffer blank injection signals). Fits are shown as dotted lines and were obtained by global fitting of the data using a 1:1 Langmuir binding model

Only 2 IgA (F4.30 and SC16C13) recognized the gp140, the SC16C13 bound with greater affinity than the anti-gp41 IgG as 3D6 and 4E10 0.35, 14.9 and 10.9 nM, respectively (cf. figure 2H and S1). F4.30 presented lower affinity to the gp140 with a K_D value of 18.8nM. The gp41 was thus bound by 3 IgA (F4.30, F4.6 and SC16C13). SC16C13 presented greater affinity than 4E10 with a K_D of 0.34 nM and 6.24 nM. F4.6 and F4.30 presented similar affinity to gp41 with a K_D of 14.4 and 14.1nM but both lower than the affinity of 4E10 to gp41 (cf. figure 2I and S1)

Recognition of viral particles by IgA1 clones

Recognition of MPER and HR2 regions of gp41 has been clearly demonstrated for the different IgA1 clones by both ELISA and SPR. However, the recognition efficiency is clearly different between clones depending on the targeted epitope region of each IgA1. To demonstrate the ability of IgA1 candidates to recognize efficiently viral HIV-1 particles, an ELISA with coated viral particles of both laboratory and primary strains was performed as described in the method section. As

negative IgA1 control, an anti-ovalbumin IgA1 was used. Free virions from BAL, LAI and CAM1970 were systematically recognized with different efficiency by the 6 MPER-specific IgA1 (Table 2). The SF162 free particles were weakly recognized by the 6 IgA1. The C6.11, C6.13, F4.5 and F4.6 recognized the virions from the 4 strains with the same potency with an increased efficiency to BAL strain. F4.30 exhibited the highest binding efficiency for each strain while the SC16C13 antibody demonstrated the weakest binding capacity. The anti-OVA IgA did not bind to CAM1970, BAL and SF162 and showed a very weak binding to LAI strain (Table 2).

Dissociation constants (K_D) for binding of IgA to immobilized gp120C41, gp140 and gp41

	LAI	CAM1970	SF162	BAL
free virion	0,02	0,04	0,01	0,01
anti-ova	0,19	0,07	0,02	0,07
C6.11	1,52	1,14	0,65	1,77
C6.13	1,24	1,66	0,65	1,94
F4.5	1,28	1,24	0,58	2,00
F4.6	1,01	1,75	0,72	1,82
F4.30	1,76	2,24	0,64	1,77
SC16.C13	0,36	0,50	0,15	0,51

Table 1: Recognition of free viral particles coated on ELISA plate by the MPER specific IgA. As negative control the antibody anti-human ovalbumin was tested and the free particles as optical blank. Values represent mean \pm SD of

two independent experiments performed in triplicate

Recognition of infected cells by IgA1 clones

Next, infection assay with TCLA LAI and SupT1 cell line was performed to demonstrate the ability of IgA1 to specifically recognize HIV-1 infected cells (Figure 3). After infection, SupT1 cells were incubated with IgA1 clones and then double-stained for p24 and IgA1 as described in the method section. Anti-ovalbumin IgA1 was also used as a negative control of binding. Percentage of double-labeled cells (namely the infected cells) but also mean of fluorescence intensity were very high for the SC16C13 clone (96% with a mean fluorescence ratio of 8.2). The efficiency to recognize infected cells was lower for the F4.6 clone (26% with a ratio of 3.5) and the C6.11 clone (12% with a ratio of 5.1). The C6.13, F4.5 and F4.30 clones are not able to recognize more than 10% infected cells with a mean fluorescence ratio of 3.8, 5.5 and 4.3 respectively. No binding was observed with the anti-OVA IgA1 clone and on non-infected cells. The proportion of recognized cells and the ratio obtained confirmed the ability of the IgA1 clones to recognize infected cells, which is probably the mechanism involved in the neutralizing activity.

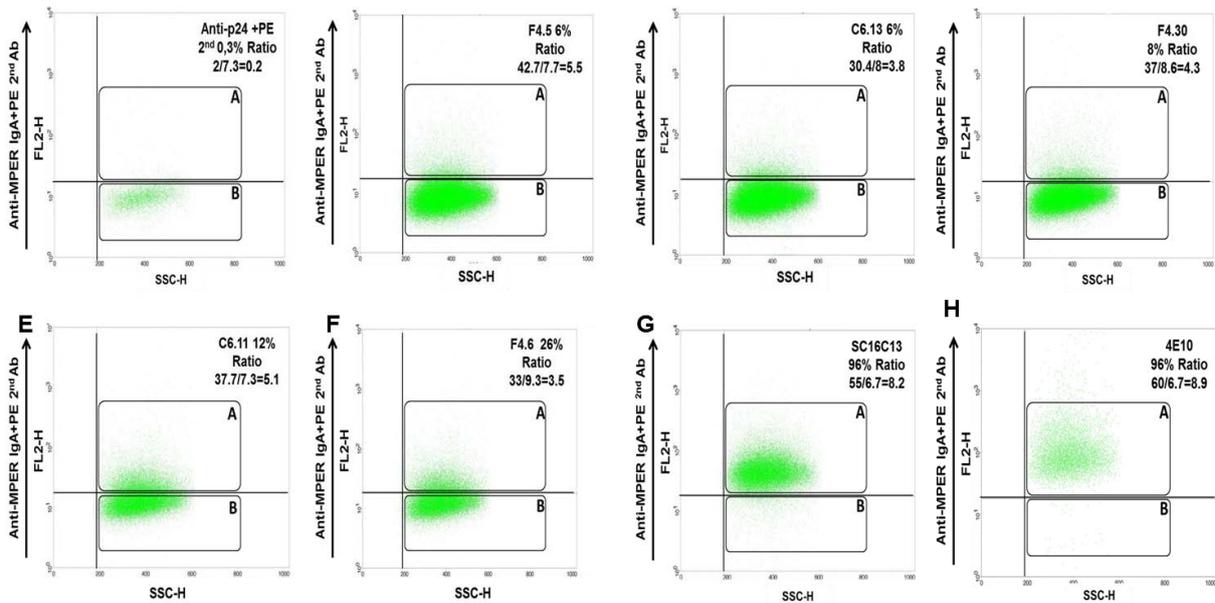


Figure 3: Binding of purified IgA on HIV-1 native particles. The ability of the anti-MPER IgA to recognize conformationally the MPER in a native and infectious context by ELISA on free virion and infected cells SUPT1 by HIV-1 strain TCLALAI. A,G) Measure of the binding of the 6 anti-MPER mAb followed by PE-2nd antibody to infected SUPT1 cells previously labeled by anti p24-FITC by flow cytometry analysis. In the upper right quadrant represents the percentage of the double labeled cells gated in the gate A. The lower right quadrant represents the cells not labeled by the anti-p24 FITC antibody. Labeling SUPT1 cell line with the well-known anti-gp41 antibody 4E10 (H) was used as positive control and the labeling with the anti-p24⁺ + anti-IgA-PE as negative control (data not shown). In the right upper corner of each sheet the ratio of the mean of fluorescence of the double labeled cells gated A on the mean of fluorescence of the rest of the cell population gated in B.

Measure of the neutralizing activity of anti-MPER IgA1

Neutralizing activity of recombinant IgA1 was tested on different HIV-1 laboratory and primary strains. Purified IgA1 MPER-specific has been tested for their neutralizing activity on infection of healthy PBMC or SUPt1 cells assay. The antibodies presented different profiles of neutralization (Figure 4). Among them, the F4.30 clone exhibited a strong neutralization activity with a high proportion of neutralized strains (56 %) with very low IC80 and IC50 in the range of few ng/ml (Figure 4 and Table 3).

The F4.30 neutralized with great potency 92UG029, 92US660, CAM1970, HVG3, LAI and the pseudovirus COT6.15 with IC80 lower than 1µg/ml. The values of IC80 observed for these strains were lower than those of 4E10 for 92UG029, LAI and COT6.15 and 2F5A for LAI and COT6.15. The IC80 obtained for 92US660, HVG3 and CAM1970 were similar to 2F5 and 4E10 except for the strain HVG3. F4.30 neutralized with moderate potency ($1 < IC_{80} < 10 \mu g/ml$) BAL and 92UG001 with IC80 5 times lower than 4E10 but near of the 2F5A 3.3, 17.19 and 0.81µg/ml respectively.

92UG001D were also moderately neutralized by F4.30 which showed IC80 of 8.62µg/ml that is 47 times lower than calculated IC80 of 4E10 with 410µg/ml and 4 times lower than 2F5 IC80

36µg/ml. SF162 and 92BR025 were weakly neutralized by the F4.30 with IC80 lower than 4E10 for only for 92BR025.

		[NAbs] for IC80/IC50 (µg/ml)															
		F4.30		C6.11		SC16C13		F4.6		C6.13		F4.5		2F5 A		4 E 10	
Strain (Tropism, Clade)	Tier	IC80	IC50	IC80	IC50	IC80	IC50	IC80	IC50	IC80	IC50	IC80	IC50	IC80	IC50	IC80	IC50
BAL (CCR5; B)	1B	3,33	2,08	2,09	0,46	2,67	1,67	0,15	0,09	9,06	4,05	8,74	2,23	0,81	2,39	>10	>10
92UG029 (CXCR4; A)	2-3	0,15	0,09	2,13	1,33	0,49	0,31	2,33	0,45	2,04	0,55	8,85	1,84	2,15	1,34	>10	9,82
92UG001 (CCR5/CXCR4; D)	2-3	8,62	5,39	2,22	1,38	>10	6,39	>10	>10	9,33	5,83	8,69	5,43	>10	>10	>10	>10
92US660 (CCR5; B)	1	0,13	0,08	0,16	0,10	0,17	0,11	0,13	0,08	0,13	0,08	0,14	0,09	0,13	0,08	0,16	0,10
HIV-1 G3 (CCR5; G)	2	0,86	0,54	0,22	0,14	>10	>10	>10	8,81	0,19	0,61	0,26	0,16	0,87	0,54	1,02	0,63
CAM1970 (R5; CRF02AG)	2-3	0,16	0,10	0,15	0,09	0,19	0,12	0,22	0,13	2,40	0,64	>10	0,49	0,15	0,09	0,16	0,10
92BR025 (CCR5; C)	1	>10	9,16	>10	0,58	3,92	2,45	4,67	2,92	>10	9,80	>10	2,42	1,49	0,93	>10	>10
SF162 (CCR5; B)	1A	>10	6,34	>10	2,34	>10	>10	8,93	2,12	>10	>10	9,89	2,61	12,92	2,33	0,62	0,39
LAI (CXCR4; B)	1	0,23	0,14	0,72	0,45	>10	2,17	>10	>10	>10	0,54	>10	8,96	0,60	0,38	2,59	1,62
COT6.15	2	0,15	0,09	0,14	0,09	11,85	0,67	2,72	0,52	2,61	0,47	2,28	0,13	10,21	0,52	0,59	0,10

Table 3: Neutralizing activity of F4.30, C6.11, C6.13, F4.5, F4.6 and SC16C13 of infection on laboratory strains and primary HIV-1 strains. The antibodies concentration the six purified IgA specific to gp41 is in µg/ml for IC50% or IC80% as described in the method section. 2F5 A is a IgA and 4E10 mAb are neutralizing antibodies anti-gp41 used as controls. The MAb neutralization titers have been color-coded as follows: cases with green background indicate an IC80 or IC50 of anti-gp41 IgA >10 µg/ml, cases with orange background indicate 1 µg/ml > IC80 or IC50 >10 µg/ml and cases with red background indicate an IC80 of < 1µg/ml

C6.11 neutralized with great efficiency the infection of 44% of the strains with IC80 lower than 1µg/ml. C6.11 neutralized the 92US660; and CAM1970 with the same potency than 4E10 and 2F5A. LAI, COT6.15 and HIVG3 are neutralized with lower IC80 than 4E10 and 2F5A. BAL, 92UG029 and 92UG001 are moderately neutralized by C6.11 but presented IC80 lower than 4E10. The 92BR025 and SF162 were weakly neutralized by this antibody with IC80 of 13.27 and 13.37µg/ml, respectively. The neutralization of 92BR025 was higher than 4E10 but lower than 2F5 and SF162 was neutralized with an IC80 of C6.11 20 times lower than 4E10 and near than the IC80 of 2F5A. The SC16C13 neutralized 33.3% of the strains with great potency.

92UG029, 92US660, CAM1970 are neutralized with IC 80 lower than 1µg/ml but near the value showed in 4E10 and 2F5. HIV-1 G3, 92UG001, are weakly neutralized while 92BR025 and BAL are moderately neutralized with IC80 of 2.67 µg/ml; SC16C13 neutralized the other strains more weakly with IC80 higher than 10µg/ml/. TF4.6 and C6.13 neutralize strongly only 3 strains with 92US660 in common and the F4.5 present weak neutralization except for the 92US660 and HIV-1 G3 that neutralized with IC80 lower than 1µg/ml. The strains SF162 and 92UG001D were not neutralized by our antibodies. More interestingly the 92BR025 is only neutralized by SC16C13 and C6.13 IgA1 while it is the strain used to immunize the transgenic α1KI mice.

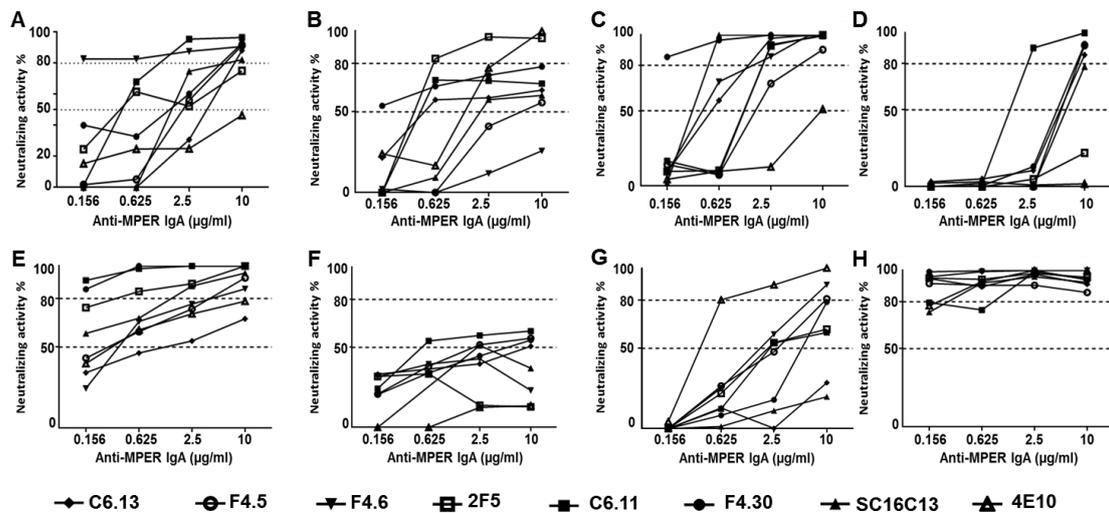


Figure 4: Neutralization activity of IgA specific to MPER on 9 isolates of HIV-1 with decreasing concentration of IgA. 4E10 and 2F5 were used as positive control. **A)** BAL (CCR5; B); **B)** LAI (CXCR4; B); **C)** 92UG029 (CXCR4; A); **D)** 92UG001 (CCR5/CXCR4; D) **E)** COT6.15 (CCR5; C) **F)** 92BR025 (CCR5; C) **G)** SF162 (CCR5; B) **H)** 92US660 (CCR5; B). These mAb were tested for dose-dependent neutralization within a concentration range of 0.156–10 µg/ml, according to the neutralization assay protocol described in Methods. For each mAb and virus combination, the neutralization from one experiment, out of three repeated experiments, is shown.

Identification of neutralizing epitopes recognize by IgA1 clones

To identify the neutralizing epitopes of the different IgA1 with potent neutralizing activity *in vitro*, neutralizing activities of IgA1 clones were measured on HIV-1 COT6.15 pseudoviruses and compared with a scanning of alanine substitutions in MPER residues (662–682) in the TZM-BI luciferase system (figure 5) (34, 35). As described for well-known MPER-specific IgG, IgA1 clone neutralizing activity was highly sensitive to the tryptophan W666 and the lysine K667 residues which are central in the recognition of the 2F5 MAbs epitope (21, 23). For the F4.30, F4.6, C6.13 and F4.5 the downstream extended epitope of 2F5 epitope merged with the upstream

epitope of the 4E10 ⁶⁶⁷KNLWSWF D/N/S I⁶⁷⁵ seems to be crucial for neutralization. However, mutation of the T⁶⁷⁶ residue reduced the F4.30 neutralizing potency and totally depleted the neutralization ability of the 3 other IgA. SC16C13 and C6.11 clones were sensitive to the W⁶⁶⁶, W⁶⁷⁰ and L⁶⁶⁹ residues which are crucial in 2F5 neutralization. These 3 IgA1 are also sensitive to the mutation of the C-terminal residues of the MPER ⁶⁷⁴D/N/S ITKWLWY⁶⁸². These observations suggest that the neutralizing epitopes recognized by IgA1 clones seem to be larger than those of 4E10 and 2F5. These data were confirmed by the calculation of a ratio of IC80 COT mutant vs IC80 COT wt for each substitution.

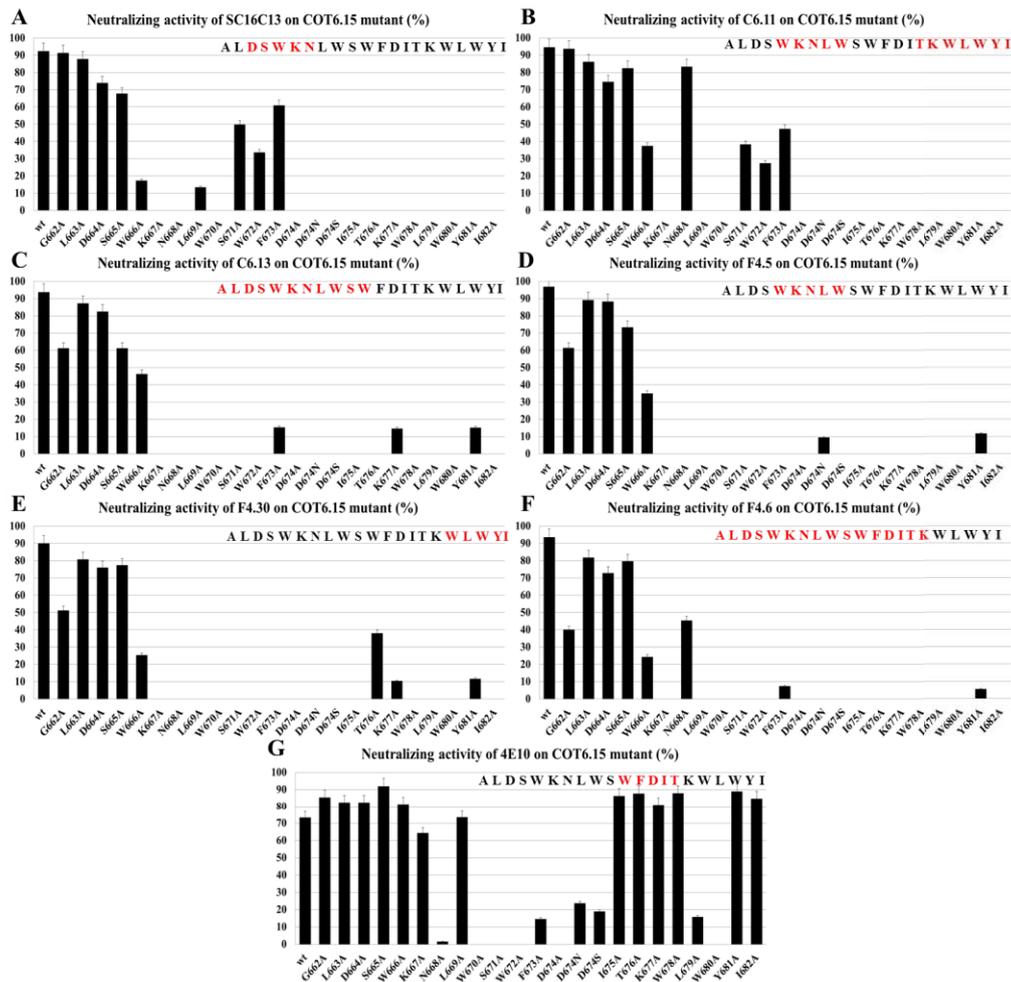


Figure 5: Screening of the neutralizing activity of IgA specific to MPER on COT6.15 pseudoviruses and cot6.15 mutant on each amino acid. At the right top of every diagram the sequence of MPER were added. A) SC16C13; B) C6.11; C) C6.13; D) F4.5; E) F4.30; F) F4.6; G) 4E10 The residues recognized by each antibody by ELISA assay on representing 15-mer of gp41 were colored. For each mAb and mutant, the value of SD is calculated for the neutralization from two independent experiment realized in triplicate.

Analysis of anti-MPER IgA autoreactivity

A property common to the previously characterized MPER-specific monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 is that they cross react with self-antigens (32, 32, and 36). In addition, binding to both the cell membrane and the Env trimer is thought to be important for optimal neutralization by

these antibodies and this autoreactivity may be an obstacle to the elicitation of similar antibodies by a vaccine. Autoreactivity of IgA1 clones was measured by different methods. First, immunoreactivity against phospholipids was analyzed by ELISA assay with purified cardiolipin and its cofactor B2GPI as described in the method section. The SC16C13 clone bound to

anionic phospholipids, such as phosphatidyl choline-cardiolipine (PC-CLP) but not to B2GPI cofactor (Table 4). Immunoreactivity against cardiolipin (figure 6) of SC16C13 was confirmed by SPR using immobilized purified cardiolipin. The curves obtained did not fit with any predictable kinetic model, likely because of the absence of saturation at high SC16C13 concentration, which might reflect aggregation. Autoreactivity of MPER-specific IgA1 clones was also tested on HEp-2 epithelial cells by immunofluorescence. Only F4.5 and SC16C13 IgA1 present strong recognition of Hep2 cells with an anti-cellular pattern as described for 2F5 or 4E10 (figure 6 F, B).

Discussion

During the last five years, many studies have reported the increasing role of Nabs during HIV-1 course. Genetic engineering and antibody cloning studies allowed forecasting and developing potent and broadly active neutralizing antibodies. These new advances permit the eliciting of antibodies directed to different key epitopes or to a specific target site, such as the QNE (37-40). Furthermore, passive administration of rare human envelope-specific monoclonal broadly Nabs to nonhuman primate models like rhesus macaques can protect them against SHIV challenge (14, 16, 41-44). Moreover, high gp120-specific Nabs seem to be one of the correlate of

Anti-MPER IgA1	Cardiolipin	HA
F4.30	0,15	0,08
C6.11	0,06	0,09
C6.13	0,19	0,09
F4.5	0,08	0,06
F4.6	0,03	0,11
SC16C13	0,98	0,09

Table 4: Recognition of cardiolipin coated on ELISA plate by the MPER specific IgA. As negative control the antibody anti-human ovalbumin was tested and human hemagglutinin A. Values represent mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicate

protection in the recent RV144 vaccine trial (45-47) even if the mucosal immune response was not investigated. The presence of systemic IgA (mainly monomeric) directed to the V1V2 variable loops was correlated with a high risk of infection (45). In contrast, the presence of IgA in parotid saliva or serum that are able to bind different key regions on gp160 as CD4bs, V2 loop or the MPER and to neutralize *in vitro* different HIV-1 strains has been described as protective IgA (5, 17). The study of NAbs in the mucosal compartment is crucial for the challenge to design a new vaccine. Several studies have described the potential role of mucosal secretory IgA to locally block infection (15, 48, and 49).

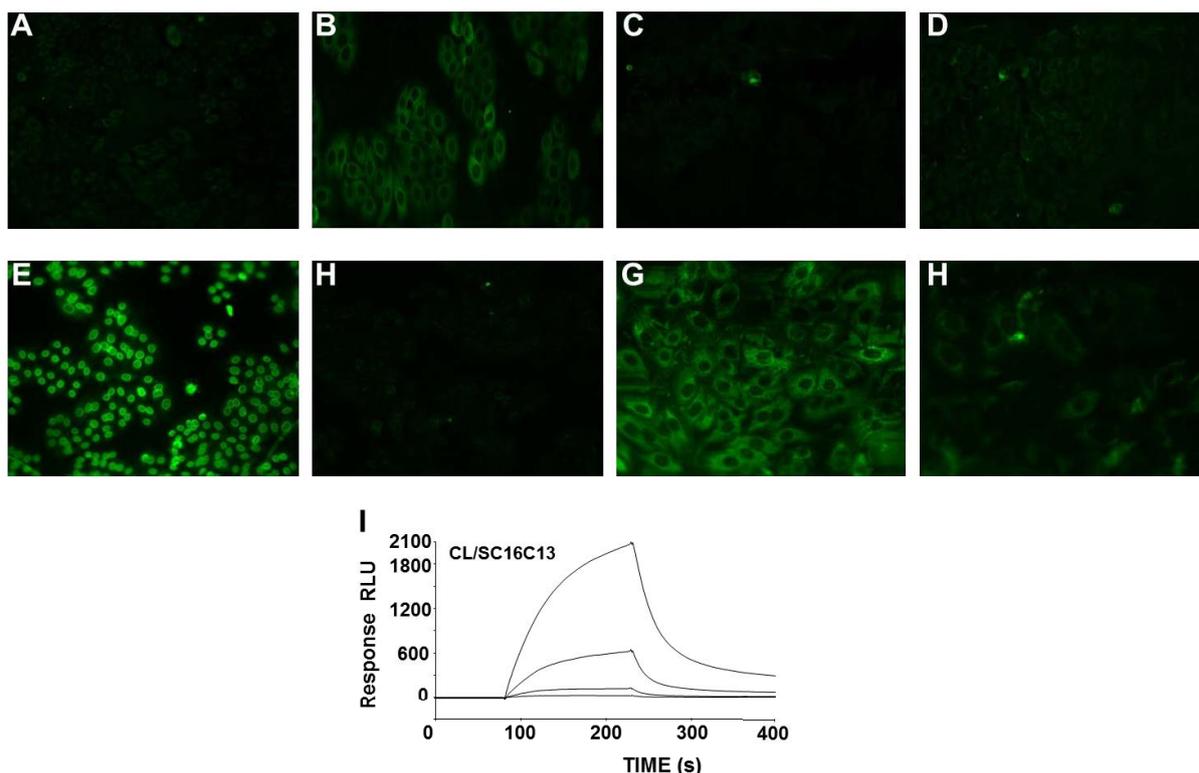


Figure 15: Analysis of anti-MPER IgA autoreactivity. *A-H*) Reactivity of antibodies with HEp-2 epithelial cells by immunofluorescence microscopy; *A*) F4.6; *B*) SC16C13; *C*) F4.30; *D*) C6.13; *E*) C6.11; *G*);F4.5; *F*) negative control is anti-human ovalbumin IgA RPE. *E*) Additional negative control with anti-nuclear and cytoplasmic antigens. Antibody concentration was 25 $\mu\text{g/ml}$. *I*) SPR analysis of cardiolipin binding to immobilized SC16C13. Cardiolipin (2, 4, 8 and 16 μM) was injected over immobilized SC16C13 as described in Materials and Methods.

Humanized mice (hu-mice) are an alternative to humans for producing antibodies (50) and may be useful for pharmacologic studies of anti-HIV drugs and passive immunization (51, 52). To date, no recombinant IgA raised against HIV-1 envelope has been generated using such type of mice. The interest to use humanized mice is related to the wide repertoire of antigens they can recognize, including when it comes from human antigens. Conversely, the development of methods for the production of human antibodies from human lymphocytes remains limited in

terms of repertoire, including autoantigen. In this study, α1K1 humanized mice were used to elicit neutralizing IgA1 specific to the MPER region of gp41. A prime boost strategy was using naked DNA as a prime by hydrodynamic IV route and HEK293gp41^{MSD} cells as a boost given rise to 13 clones able to recognize specifically the gp41. Prime boost strategy was used to increase the immunogenicity of the gp41 immunogen (30). Among the clones, only 6 present an efficient and specific recognition of HEK293gp41^{MSD} bearing the gp41 in a

conformational shape at their surface. All of the 6 monoclonal antibodies selected were able to bind large neutralizing epitopes on gp41. F4.6, F4.30 and C6.13 recognize both MPER neutralizing epitopes ELDKW and WFD/NIT and the HR2 regions with different efficiency while the F4.6 also recognizes an epitope in the immunosuppressor region. The C6.11 binds the KWA motif in the ELDKWA 2F5 neutralizing epitope. F4.5 and SC16C13 recognize epitopes on HR2 and the ELDKWA pattern.

The IgA1 clones are able to recognize very specifically viral particles of different HIV-1 strains (LAI, SF162, CAM1970 and BAL) but also infected cells. The SC16C13 IgA1 recognized more than 96% of infected cells. These data were correlated with the results obtained by SPR with immobilized gp41, gp140 and gp120C41 proteins. IgA1 clones present high affinity to the gp120c41 protein. A strong correlation was observed between a strong recognition of infected cells and a high affinity to gp120c41, as for the SC16C13 which presented a high affinity to gp120C41 with a K_D of 1.57 nM (Fig. 2B) and showed the highest score in recognition of infected cells (96%). This correlation was maintained for the other IgA1 while the F4.30 presented both the highest K_D for binding to gp120c41 (38.8 nM) and recognized only 8% of infected cells. SC16C13, F4.6 and F4.30 IgA1 presented also a strong affinity to the gp41 ectodomain. F4.30 and SC16C13 are the only IgA1 that recognized the gp140. F4.30 presented an affinity 4 times weaker than 4E10 to gp140. Whereas SC16C13 presented an affinity

5 times stronger than 4E10 to gp140. Strikingly, the affinity of IgA1 clones for the gp41 was inversely correlated to their potency of neutralization. Indeed the F4.30 presented the highest score of neutralization with 56% of strains neutralized. This antibody neutralized 80% of the Tier 2-3 strains with a strong potency but presented weak affinity to the 3 forms of gp41 presented in the SPR assay. Whilst the SC16C13 neutralized 30% of strains with 40% of the Tier 2-3 strains but presented strongest affinity to the 3 forms of gp41 in the SPR assay. The high neutralization capacities in comparison with the well-known IgG 4E10 could be explained by a better recognition of the gp41 conformational shape of F4.30. A finer mapping of the IgA anti-MPER was made on mutated pseudovirus COT6.15 presenting single mutations on each residue compounding the MPER (34) in the TZM-bl assay. Screening of F4.30 epitope allows to define a large epitope restricted to the upstream residues of the MPER and the C-terminal region of HR2, since all mutations downstream the tryptophan W660, which is involved in the neutralizing epitope of the 2F5 monoclonal neutralizing antibody, reduce drastically the neutralizing activity of this antibody.

These results suggest that the epitope recognized can be discontinuous and involve other regions than the gp41 and the MPER. In fact the polymeric nature of the IgA could suggest the possibility of their ability to bind large functional epitopes that can be located on adjacent proteins like gp41 and gp120 during the infection process or to HR2/HR1 domains in fusion complex state. Other

studies described neutralizing IgA antibodies from patients directed against different key regions on the gp160 surface like the super antigenic site on gp120 and the CD4 binding site (9, 10) which are discontinuous epitopes. One of the most interesting properties of the neutralizing antibodies characterized MPER monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 is that they cross react with self-antigens. Only the SC16C13 IgA1 binds with a similar pattern to Hep-2 cells and 2F5 or 4E10. This binding is also perfectly correlated to the capacity of the SC16C3 to bind to cardiolipin in the SPR assay (figure 6).

In this work, the most interesting mAbs elicited have the capacity to strongly neutralize 80% of the strains Tier 2 tested with different clades A, B, C, G and AG and tier1 strains like LAI, and 92US660 clade B. F4.30 neutralized moderately the BAL clade B and 92UG001. In this study we observed that the affinity of our antibodies was not correlated with their neutralizing potency. This point has to be confirmed by testing the binding of F4.30 and SC16C13 by SPR by immobilizing the IgA1 and using HEK293gp41^{MSD} cells or free virions as analytes. This result has been confirmed in flow cytometry since the SC16C13 bound to more than 96% of infected cells by the LAI. The binding polyspecificity to cardiolipin could explain the low activity of these antibodies, even if, occasionally, some autoreactivity can be related to the development of HIV bNABs at both the cellular level and at the level of serum antibodies; as is the case for 9G4 bNABs that presents self-reactivity to SLE and neutralizing properties (53). In

contrast, the F4.30 that bound to gp120c41 with weaker affinity (about 24 times: 38.8/1.57) than the SC16C13 presents neutralizing activity cross-clade. Studies of potent antibodies like the 2G12 described (54) the capacity of monomeric or dimeric 2G12 to mediate ADCC or to activate the complement system *in vitro* (55, 56). Indeed, the capacity of F4.30 to mediate ADCC or ADCVI against infected cells needs to be studied. These two mAbs (F4.30 and SC16C13) are to our knowledge the first recombinant neutralizing cross clade IgA1 described in the literature. This work strengthens our previous studies of the role of anti MPER IgA described in parotid saliva of ESN and HIV + individual (5, 17, and 57). Further understanding of the interaction of F4.30 with gp41 at the atomic level would require crystallographic studies. Our antibody could be easily integrated in a therapy to block the entry of HIV-1 after a recent viral exposition or to reduce, after systemic administration, the viral burden and the massive CD4 cell count depletion in HIV-1 reservoirs as the intestine. Potent monoclonal antibodies acquire their neutralization potency from their ability to block a functionally important site that is critical for viral entry like in the CD4 binding site antibodies. Nonetheless, the breadth and potency of F4.30 demonstrates a conserved site of gp41 as an important target antigen for HIV neutralization. These results confirm the high interest in MPER-based HIV vaccine design.

Methods

Reagents

The following materials were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: primary HIV-1 isolates BAL, 92UG029, 92UG001, 92US660, HIV-1 G3, CAM1970, 92BR025, SF162, LAI, the HIV-1 subtype B (MN), Env Peptides (15-mer) Complete Set. Gp140 recombinant protein (strain 97/CN/54, clade C/B) and 3D6, 4E10, 2F5 mAbs were obtained from Polymun Scientific (Vienna, Austria). Gp41 ectodomain from HXB2 strain was produced in *Escherichia coli* in our laboratory. Human HEK 293 cell lines were obtained from American Type Culture Collection and SP2/0 cells were obtained from UMR CNRS 6101 (Limoges, France). HEK393gp41^{MSD} were developed and characterized in our research group (29). The mice α 1kl (30, 33) were immunized and provided by the UMR CNRS 6101 (Limoges, France).

Immunization of mice and monoclonal antibody production

The α 1Kl mice (6–8 weeks old, 2 x n4) were immunized with 50 μ g of naked DNA (plasmid display HR1-PID-HR2 used to develop the HEK293p41^{MSD}) in 2.5ml Ringer solution, this hydrodynamics-based immunization being realized by intravenous injection via the tail vein. Next two groups of mice were immunized according to 2 different protocols of immunization. At day 14, one group was immunized intraperitoneally (i.p) immunized with 1.10^6 cells of HEK 293-gp41^{MSD} in complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma Aldrich) followed at day 45 by one i.p. injection with 1.10^6 cells in incomplete Freund's adjuvant (IFA)

(Sigma Aldrich), one i.p. injection with 1.10^6 cells in PBS and finally one intravenous boost with 1.10^6 cells in PBS at day 60. Use of CFA/IFA adjuvants allow to reduce the number of human HEK cells for immunization, to increase the number of accessible epitopes in the emulsion and finally to facilitate the migration of APCs to the spleen. All mice were sacrificed 3 days after the last boost.

The second group of mice was immunized at day 15 using hydrodynamic method with 50 μ g of naked DNA in 2.5ml Ringer solution followed by i.p injection with 1.10^6 cells in CFA at day 45 and finally one intravenous boost with 1.10^6 cells in PBS at day 60. Hydrodynamics enhances the DNA transfection efficiency, allowing the injected DNA to reach all the organs rapidly. The liver will literally pump a large part of the DNA solution in an opposite direction of the regular blood circulation, thus permitting expression of the transferred DNA genes in liver cells.

The splenocytes were fused immediately with myeloma cells SP2/0 by using polyethylene glycol-1000 as fusion reagent. The hybridoma cells were cultured in DMEM high glucose – L-glutamate medium (PAA, Velizy-Villacoublay, France) supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco, Saint Aubin, France), 0.1 mmol/l hypoxanthine, 100 U/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin in 96-well plates, until the colonies of hybridoma cells were grown. Initially, the hybridoma cells were diluted in round-bottom 96-well plates by limiting dilutions to obtain 0.5 cells per well and cultured for 7 days.

Purification of anti-MPER IgA

Hybridomas were expanded in DMEM high glucose –L-glutamate medium (PAA) supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco), 0.1 mmol/l hypoxanthine, 100 U/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin) and IL-6 at .5 µg/mL (R&D Sytem, Abingdon, UK). Supernatants were harvested and purified by peptide M affinity chromatography (Invivogen, Toulouse, France). Purified IgA were then concentrated on Amicon® Ultra filters 50KDa (Millipore, Lyon, France).

Epitope mapping of monoclonal antibodies

ELISA was carried out using the gp41 HXB2 clade B produced in *E.coli*, the gp140 strain 97/CN/54 and Consensus HXB2 (clade B) env 15-mer peptides complete set that cover and overlap the gp41. An irrelevant peptide representing the human haemagglutinin A (HA) was used as a negative control. Briefly, each peptide was coated on a 96-well plate (Maxisorp, Nunc) at 5 mg/ml in 0.1 mol/l sodium carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. The plates were washed with tris-buffered saline (TBS; 144 mmol/l NaCl, 25 mmol/l Tris –HCL, pH 7.5) containing 0.5% tween 20 and blocked with the same buffer and 2% BSA for 1 h at 37°C. After washing, 100 µl of the generated antibodies (5µg/ml) diluted in TBS were added to the wells and incubated 2 h at 37°C. After washing, the detection was done by using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgA and OPD substrate. The absorbance was read at 492 nm. All assays were

performed in triplicate (Multiskan Microplate Photometer, Thermo scientific).

An ELISA was also realized with coated free virion and antibodies according to (32).

Immunofluorescence on HEK293gp41^{MSD}

Binding of our anti-MPER IgA at the cell surface of HEK293gp41^{MSD} was visualized by immunofluorescence microscopy. The HEK 293-gp41MSD cells were cultured for 2 days in 96-well plates and fixed in cold acetone. Then, IgA were incubated for 30 min on fixed cells at a concentration of 5µg/ml/well. After 3 washes with PBS containing 0.2% Tween 20,, cells were incubated for 30 min with FITC conjugated goat anti-human IgG or anti-human IgA when appropriate (P.A.R.I.S., Compiègne, France). Different anti-gp41 human monoclonal antibodies 4E10, 2F5, 3D6 at 10µg/ml were used as positive controls and an anti-myc conjugated with FITC was used as positive control of gp41 expression. The labeling was visualized by fluorescence microscopy (Nikon TE 2000 Microscope, Burlingame, California, USA) using NIS-Elements software.

Flow Cytometry

Membrane binding to the gp41 on the HEK293gp41^{MSD} cells was also studied by flow cytometry. 5 µg/ml of IgA or positive control as 4E10 or 2F5 were incubated 45 min at 37°C. The cells were washed three times and then incubated with R-phycoerythrin (R-PE) goat antihuman IgA (P.A.R.I.S., Compiègne, France) for 30 min at 37C. After washing, cells were analyzed by

flow cytometry. If the labeling is multiple like in the binding assay, infected cells are firstly labeled with anti-p24 KC57-FITC according to the provider conditions (Beckman Coulter, Villepinte, France). After that the IgA anti MPER are incubated 45 at 37° and after 3 washes incubate with R-PE goat anti-human IgA (P.A.R.I.S., Compiègne, France). During acquisition of data at least, 10 000 events were analyzed on FACScan (BD, Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

Virus neutralization assays

Measure of the neutralizing activity of purified gp41-specific antibodies was performed using T-cell line adapted strain LAI (clade B) or primary isolates of clade A (92UG029), B (BAL, SF162, 92US660 and QHO), C (92BR025), G(HIV-1 G3), CRF02 AG (CAM1970) and D (92UG001). Neutralizing activities were tested in duplicate and repeated three times. For LAI assay, CD4+/CXCR4+ SupT1 cells were incubated at 37°C under 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% FCS. Infection was performed in 96-well rounded bottom plates. Purified antibodies (50 µl) were incubated with an equal volume of virus containing a 100 TCID₅₀ dose for 2 h at 37°C. Then, 3.10⁵ SupT1 cells/well were added. At day 1, infected cells were washed twice with tissue culture medium. Supernatants were collected 7 days post-infection and p24 ELISA measurement was performed (HIV-1 p24 Antigen Capture Assay; Advanced Bioscience Laboratories, Inc. USA). For the BaL strain, neutralizing activity of purified antibodies was determined as previously described (5, 57) Briefly,

peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors (generous gift from EFS Auvergne Loire, France) and stimulated with phytohaemagglutinin (5 µg/ml) and 200 U/ml of recombinant human interleukin-2 (Abcys, Paris, France). The cells were infected with a 100 TCID₅₀ dose for 3 h at 37°C in the presence of purified antibodies and after 48 h, the cells were washed twice. Infected supernatants were collected 7 days post-infection and ELISA p24 measurement was performed. Neutralizing activity of purified antibodies was also tested on stimulated PBMC infected with CAM1970, 92UG029, 92US660, 92BR025, 93BR025, HIV-1 G3 and 92UG001 primary HIV-1 isolates as previously described. The cells were infected with a 100 TCID₅₀ dose in the presence of serially diluted antibody. The supernatants were collected 10 days post-infection and p24 measurement was performed. The percentage of neutralization was calculated as the reduction of p24 production. IC₅₀ and IC₈₀ were determined as the lower antibody concentration able to confer 50 and 80% of neutralization, respectively.

Production of pseudoviruses COT6.15 and mutants

Pseudoviruses were generated by cotransfecting the COT6.15 (35, 58) or its mutants Env plasmid with pSG3_Env, using the Lyovect transfection reagent (InvivoGen) in HEK293 cells in Petri dish. The production of pseudoviruses is confirmed by quantification of p24 produced and their infectivity and measurement of their fifty percent

tissue culture infective doses (TCID₅₀s) were quantified by infecting TZM-BI cells (JC53-bl) with serial dilutions of the supernatant in triplicate in the presence of DEAE-dextran (30 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The infection was monitored 24 h later by evaluating the luciferase activity, using the Bright Glo reagent (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's instructions. Luminescence was measured in a Berthold tristar multilabel counter (Berthold THOIRY, France) 5s per/well. The TCID₅₀ was calculated as described previously (59). Wells with relative light unit readings of 10 times that of the negative control were considered positive.

Affinity of anti-MPER IgA:

Biacore analyses were conducted on a BIAcore 3000 Instrument (GE healthcare, Velizy-Villacoublay, France). To study the interaction of anti-MPER IgA with gp41 HXB2, gp140 strain 97/CN/54 and gp120c41 (abcys eurobio, Courtaboeuf, France) we first immobilized the proteins on a CM5 sensorchip. To determine affinity constants, increasing concentrations of antibodies (0.5nM-640nM) were injected for 120s at a flow rate of 10µL/min. Between injections, the sensorchip was regenerated using 10mM HCl (10 s). In all cases the dissociation step was done using running buffer. Global curve fitting was carried out using BiaEvaluation software version 4.1. Before fitting the sensorgram control alone was subtracted from the overall data.

Autospecificity of anti-MPER IgA:

Reactivity to HIV-1 negative human epithelial (HEp-2) cells was determined by indirect immunofluorescence on slides using FITC-conjugated goat anti-human IgAGM polyclonal antibody (Instrument Laboratory, France). Observations were conducted with Nikon TE 2000 Microscope, Burlingame, California, USA using NIS-Elements software. Slides were taken of each monoclonal antibody binding to HEp-2 cells. Monoclonal antibodies concentrations assayed were 25, 1 µg ml⁻¹. 10 µl of each concentration were incubated with the Hep2 cells and the test performed per the manufacturer's specifications. Autoreactivity were also tested by ELISA assay with cardiolipine (Thermofisher Phadia Illkirch, France) according to

Statistical analysis

The statistical difference in *in vitro* experiments between control and antibodies was assessed using Student's t test (Statistica 5.1 software; Statsoft Inc., Maison-Alfort, France). A P value below 0.05 has been considered statistically significant.

REFERENCES

1. Kaul R, *et al* (1999) HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant kenyan sex workers. *AIDS* 13(1): 23-29.
2. Quinn TC & Overbaugh J (2005) HIV/AIDS in women: An expanding epidemic. *Science* 308(5728): 1582-1583.
3. Keele BF & Estes JD (2011) Barriers to mucosal transmission of

- immunodeficiency viruses. *Blood* 118(4): 839-846.
4. Matsuda S & Noda M (2000) Detection of IgA-binding sites on human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoproteins, Gp120 and Gp41. *Microbiol Immunol* 44(11): 923-929.
 5. Vincent N, Malvoisin E, Pozzetto B, Lucht F & Genin C (2004) Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients. *AIDS* 18(1): 37-43.
 6. Moja P, *et al* (2000) Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediated by parotid IgA of HIV-1-infected patients. *J Infect Dis* 181(5): 1607-1613.
 7. Kaul R, *et al* (2001) Mucosal IgA in exposed, uninfected subjects: Evidence for a role in protection against HIV infection. *AIDS* 15(3): 431-432.
 8. Mestecky J, *et al* (2011) Scarcity or absence of humoral immune responses in the plasma and cervicovaginal lavage fluids of heavily HIV-1-exposed but persistently seronegative women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27(5): 469-486.
 9. Nishiyama Y, Karle S, Planque S, Taguchi H & Paul S (2007) Antibodies to the superantigenic site of HIV-1 gp120: Hydrolytic and binding activities of the light chain subunit. *Mol Immunol* 44(10): 2707-2718.
 10. Planque S, *et al* (2010) Neutralization of genetically diverse HIV-1 strains by IgA antibodies to the gp120-CD4-binding site from long-term survivors of HIV infection. *AIDS* 24(6): 875-884.
 11. Planque SA, *et al* (2012) Antibodies to a superantigenic glycoprotein 120 epitope as the basis for developing an HIV vaccine. *J Immunol* 189(11): 5367-5381.
 12. Granados-Gonzalez V, *et al* (2009) Neutralizing inter-clade cross-reactivity of HIV-1 V1/V2-specific secretory immunoglobulin A in colombian and french cohorts. *AIDS* 23(16): 2219-2222.
 13. Granados-Gonzalez V, *et al* (2009) Role of the HIV-1 gp120 V1/V2 domains in the induction of neutralizing antibodies]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27(9): 523-530.
 14. Mascola JR & Montefiori DC (2010) The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 28: 413-444.
 15. Bomsel M, *et al* (2011) Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHV challenges. *Immunity* 34(2): 269-280.
 16. Mascola JR (2002) Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 20(15): 1922-1925.
 17. Benjelloun F, Dawood R, Urcuqui-Inchima S., Chanut B., Verrier B, Lucht F., Genin C. and Paul S. (2013) "Anti-MPER parotid IgA in ESN can protect from HIV infection in vitro". *AIDS*
 18. Clerici M, *et al* (2002) Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 16(13): 1731-1741.
 19. Pastori C, *et al* (2000) HIV neutralizing IgA in exposed seronegative subjects recognise an epitope within the gp41 coiled-coil

pocket. *J Biol Regul Homeost Agents* 14(1): 15-21.

20. Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E & Blumenthal R (1999) Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J Virol* 73(7): 6089-6092.

21. Ofek G, *et al* (2004) Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* 78(19): 10724-10737.

22. Zwick MB, *et al* (2005) Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* 79(2): 1252-1261.

23. Zwick MB & Burton DR (2007) HIV-1 neutralization: Mechanisms and relevance to vaccine design. *Curr HIV Res* 5(6): 608-624.

24. Huang J, *et al* (2012) Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491(7424): 406-412.

25. Buchacher A, *et al* (1994) Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and epstein-barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(4): 359-369.

26. Zwick MB, *et al* (2001) Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 75(22): 10892-10905.

27. Alfsen A, Iniguez P, Bouguyon E & Bomsel M (2001) Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 166(10): 6257-6265.

28. Tudor D & Bomsel M (2011) The broadly neutralizing HIV-1 IgG 2F5 elicits gp41-specific antibody-dependent cell cytotoxicity in a FcγRI-dependent manner. *AIDS* 25(6): 751-759.

29. Dawood R, *et al* (2013) **Generation of HIV-1 potent and broad neutralizing antibodies by immunization with postfusion HR1/HR2 complex.** *AIDS* 27(5): 717-730.

30. Laffleur B, Pascal V, Sirac C & Cogne M (2012) Production of human or humanized antibodies in mice. *Methods Mol Biol* 901: 149-159.

31. Akkina R (2013) New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. *Virology* 435(1): 14-28.

32. Haynes BF, *et al* (2005) Cardiophilic polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308(5730): 1906-1908.

33. Duchez S, *et al* (2010) Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7): 3064-3069.

34. Gray ES, *et al* (2009) Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol* 83(21): 11265-11274.

35. Gray ES, Meyers T, Gray G, Montefiori DC & Morris L (2006) Insensitivity of paediatric HIV-1 subtype C viruses to broadly neutralising monoclonal antibodies raised against subtype B. *PLoS Med* 3(7): e255.
36. Haynes BF, Moody MA, Verkoczy L, Kelsoe G & Alam SM (2005) Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: A hypothesis. *Hum Antibodies* 14(3-4): 59-67.
37. Scheid JF, *et al* (2011) Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333(6049): 1633-1637.
38. Scheid JF, *et al* (2009) Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458(7238): 636-640.
39. Mouquet H, Warncke M, Scheid JF, Seaman MS & Nussenzweig MC (2012) Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(3): 875-880.
40. Wu X, *et al* (2011) Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333(6049): 1593-1602.
41. Hessel AJ, *et al* (2009) Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat Med* 15(8): 951-954.
42. Hessel AJ, *et al* (2009) Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog* 5(5): e1000433.
43. Hessel AJ, *et al* (2007) Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 449(7158): 101-104.
44. Montefiori DC & Mascola JR (2009) Neutralizing antibodies against HIV-1: Can we elicit them with vaccines and how much do we need?. *Curr Opin HIV AIDS* 4(5): 347-351.
45. Haynes BF, *et al* (2012) Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 366(14): 1275-1286.
46. Rolland M & Gilbert P (2012) Evaluating immune correlates in HIV type 1 vaccine efficacy trials: What RV144 may provide. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28(4): 400-404.
47. Rerks-Ngarm S, *et al* (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in thailand. *N Engl J Med* 361(23): 2209-2220.
48. Mascola JR, *et al* (2000) Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 6(2): 207-210.
49. Belec L, *et al* (2001) Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative african women. *J Infect Dis* 184(11): 1412-1422.
50. Cogne M, Duchez S & Pascal V (2009) Transgenesis and humanization of murine antibodies. *Med Sci (Paris)* 25(12): 1149-1154.
51. Denton PW, *et al* (2008) Antiretroviral pre-exposure prophylaxis prevents vaginal transmission of HIV-1

in humanized BLT mice. *PLoS Med* 5(1): e16.

52. Balazs AB, *et al* (2011) Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* 481(7379): 81-84.

53. Kobie JJ, *et al* (2012) 9G4 autoreactivity is increased in HIV-infected patients and correlates with HIV broadly neutralizing serum activity. *PLoS One* 7(4): e35356.

54. Platt EJ, Gomes MM & Kabat D (2012) Kinetic mechanism for HIV-1 neutralization by antibody 2G12 entails reversible glycan binding that slows cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*

55. Trkola A, *et al* (1996) Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70(2): 1100-1108.

56. Klein JS, Webster A, Gnanaprasam PN, Galimidi RP & Bjorkman PJ (2010) A dimeric form of the HIV-1 antibody 2G12 elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *AIDS* 24(11): 1633-1640.

57. Vincent N, *et al* (2008) Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* 22(16): 2075-2085.

58. Morris L, *et al* (2011) Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting. *PLoS One* 6(9): e23532.

59. Gray ES, Moore PL, Pantophlet RA & Morris L (2007) N-linked glycan modifications in gp120 of human immunodeficiency virus type 1 subtype

C render partial sensitivity to 2G12 antibody neutralization. *J Virol* 81(19): 10769-10776.

Dans cette étude, nous avons voulu savoir si la gp41 pouvait être un bon immunogène capable d'induire des réponses immunitaires IgA1 neutralisantes contre le VIH. Nous avons immunisé plusieurs souris selon un protocole incluant une première injection par voie IV du plasmide nu codant la gp41 du virus HXB2. Cette première immunisation dite hydrodynamique consiste en l'injection d'un volume important de soluté contenant l'ADN dans la veine caudale en un temps court (7s) [372]. Cette première immunisation a été suivie de rappels vaccinaux à l'aide des cellules HEK293gp41^{MSD}. Ces cellules expriment la gp41 sur leur surface de manière conformationnelle [373]. Suite à ces immunisations, nous avons pu isoler et immortaliser plus de 2300 clones d'hybridomes de cellules B. Le surnageant de chaque clone a été testé par immunofluorescence sur la lignée HEK293-gp41^{MSD} et sur des cellules non transfectées. Parmi ces clones, seuls 13 étaient capables de reconnaître spécifiquement la lignée transfectée. Ces clones ont été amplifiés puis les IgA1 de chaque clone ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur peptide M puis concentrées. Un deuxième criblage a été réalisé par immunofluorescence. Ce dernier a permis la sélection de 6 anticorps (F4.5, F4.6, F4.30, C6.11, C6.13 et SC16C13) capables de reconnaître fortement et spécifiquement la lignée HEK293gp41^{MSD}.

L'étude des IgA générées a permis d'observer que la totalité de ces anticorps reconnaissent des épitopes étendus, discontinus et conformationnels sur la gp41. En effet, toutes les IgA1 ont montré une reconnaissance simultanée d'au moins 2 régions sur la gp41 (MPER et HR2). Les 6 IgA1 ont toutes montré leur capacité à se lier à des formes conformationnelles dans des contextes membranaires ou infectieux. Les 6 IgA sont capables de se lier à des particules virales libres de 4 souches virales différentes ainsi qu'à des cellules infectées. Les résultats de BIAcore sur 3 formes différentes de la gp41 ont permis de confirmer cette spécificité des IgA1 vis-à-vis de la gp41. En effet, les IgA produites ont été toutes capables de se lier à la gp120C41 avec une grande affinité. Par exemple l'IgA1 SC16C13 présente une affinité supérieure à l'IgG 4E10. Concernant les mesures SPR réalisées avec la gp140, seules les IgA1 F4.30 et SC16C13 se sont liées à cette protéine et présentent respectivement des affinités 9 fois supérieures pour le SC16C13 et 3 fois inférieures à l'affinité du 4 E 10. Enfin, les IgA1 F4.6 et SC16C13 se lient avec la même affinité que l'IgG 4E10 à la gp41 alors que le F4.30 présente une affinité deux fois plus faible. L'étude des propriétés neutralisantes des IgA1 a montré que toutes les IgA1 présentent des profils de neutralisation hétérogènes vis-à-vis des souches de laboratoires et primaires utilisées. L'IgA1 F4.30 présente le meilleur profil de neutralisation avec 56% des souches testées neutralisées dont 80% de souches tier 2-3 (peu sensibles à la neutralisation avec des IC80 de l'ordre du ng/ml). L'efficacité de neutralisation de cet anticorps est similaire à celle obtenue avec le 4E10 et l'IgA 2F5 pour 44% des souches testées mais supérieure à celle du 4E10 pour 2 souches. L'IgA1 C6.11 présente une efficacité importante de neutralisation (44% des souches testées avec 33% de souches avec une IC80 similaire au 4E10 et à l'IgA 2F5).

L'IgA1 SC16C13 neutralise 33,3% des souches avec une IC80 inférieure à 1µg/ml. Ces résultats confirment la capacité de neutralisation des IgA1 anti-MPER. Nous avons pu constater que les constantes d'affinité obtenues en BIAcore étaient inversement corrélées à l'efficacité de neutralisation et à la capacité de reconnaître les cellules infectées. Il semble donc que l'efficacité de neutralisation de ces IgA1 soit associée à une interaction d'affinité moyenne ou faible avec la gp41. La faible neutralisation de la souche SF162 peut s'expliquer par la faible reconnaissance observée des particules virales en ELISA. Il a déjà été décrit que la souche SF162 présentait une mutation au niveau des résidus D674 et F673 dans l'épitope du 4E10 ⁶⁷²WFDIS⁶⁷⁶ [374]. Le résidu D674 est le seul site de glycosylation présent sur MPER. La séquence de l'isolat 92UG001D présente également cette mutation ⁶⁷²WFSIT⁶⁷⁶. La présence de cette mutation est corrélée à une absence d'efficacité de neutralisation de nos IgA1 et des anticorps IgA1 4E10 et 2F5.

Nous avons voulu affiner l'étude de l'épitope reconnu par les IgA1 anti-MPER et pour ce faire nous avons testé leur activité neutralisante sur le pseudovirus COT6.15. Cette efficacité de neutralisation a été comparée à celle sur des mutants par substitution d'alanine des résidus de la région MPER (662-682) dans le système TZM-BL luciférase [268, 375]. Nous avons pu observer que les mutations des résidus tryptophanes W⁶⁶⁶ et W⁶⁷⁰ et de la lysine K⁶⁶⁷ de l'épitope du 2F5 [110-111] réduisaient considérablement la capacité de neutralisation des IgA1. Pour les anticorps F4.30, F4.6, C6.13 et F4.5, les résidus en aval de l'épitope du 2F5 et les acides aminés en amont de l'épitope du 4E10 semblent être cruciaux pour la neutralisation ⁶⁶⁷KNLWSWF D/N/S I⁶⁷⁵. La substitution de l'acide aminé D⁶⁷⁴ semble confirmer les résultats de neutralisation puisque toutes les IgA1 sont sensibles à cette mutation. La substitution du résidu T⁶⁷⁶ réduit la capacité neutralisante du F4.30 et abolit complètement la capacité neutralisante des 5 autres IgA1. Les IgA1 SC16C13, C6.11, F4.6 semblent être sensibles aux mutations de la partie C-terminale du MPER ⁶⁷⁴D/N/S ITKWLWYI⁶⁸². Ces observations confirment les résultats obtenus avec les peptides 15-mer et indiquent que les IgA1 reconnaissent les épitopes du 2F5 et du 4E10 mais de manière élargie. Ces résultats démontrent aussi une probable reconnaissance d'épitopes non linéaires conformationnels ou discontinus.

Enfin, nous avons voulu observer la capacité des IgA1 à reconnaître des autoantigènes notamment les phospholipides membranaires comme la cardiolipine. Nous avons testé, dans un premier temps, la capacité de nos IgA1 à fixer des cellules Hep2 par immunofluorescence. En parallèle, l'immunoréactivité de nos IgA1 avec la cardiolipine a été mesurée par ELISA et par BIAcore. L'IgA1 SC16C13 reconnaît spécifiquement les cellules Hep-2 ainsi que la cardiolipine en ELISA. En BIAcore, cet anticorps s'est lié à la cardiolipine sans qu'on puisse calculer de constantes d'affinité. L'IgA1 C6.13 présente une faible reconnaissance en ELISA et en immunofluorescence. Les IgA1 F4.5 et C6.11 présentent une reconnaissance modérée en immunofluorescence alors qu'en ELISA, ils ne présentent pas de liaison

à la cardiolipine ce qui suggère la reconnaissance d'autres types d'autoantigènes nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires. L'anticorps F4.30 ne présente aucune immunoréactivité, faisant de lui un candidat particulièrement intéressant en thérapeutique. Notre étude a permis de confirmer l'intérêt que peut représenter la gp41 dans l'induction d'une réponse anticorps neutralisante. Nous avons pu démontrer que les anticorps produits dans ce modèle murin humanisé présentent des capacités de reconnaissance de la gp41 sous différentes formes ainsi que de fortes propriétés neutralisantes pour différentes souches de laboratoire et primaires de différents clades. Ces anticorps sont dirigés contre les principaux épitopes de la région MPER, les épitopes du 2F5 et du 4E10 mais semblent reconnaître ces épitopes dans des configurations plus larges ce qui peut suggérer la reconnaissance d'un épitope conformationnel discontinu. Ces premiers résultats sont à notre connaissance les premiers à décrire la génération d'anticorps de type IgA1 anti-MPER neutralisants dans un modèle murin humanisé. La caractérisation de ces anticorps devra se poursuivre par l'étude d'autres fonctionnalités liées à la protection par les IgA.

Afin de compléter notre étude, il paraît nécessaire d'étudier les différentes fonctions antivirales de nos IgA1. Nous souhaitons par exemple évaluer la capacité des IgA1 à bloquer la formation du complexe de fusion *in vitro*. En effet plusieurs études ont démontré le rôle des anticorps monoclonaux neutralisants dans l'inhibition de la formation du complexe de fusion [102, 376]. L'inhibition de la formation du complexe de fusion sera réalisée par ELISA en immobilisant des peptides représentant les régions HR1 ou HR2 puis en mettant en compétition la région partenaire avec les IgA, comme décrit précédemment [373]. Les complexes formés pourront être révélés grâce à un anticorps dirigé contre le complexe de fusion. Nous souhaitons également évaluer la capacité d'inhibition de l'infection cellule à cellule et la formation de syncytia par une technique de « Dye to dye transfer » (transfert de fluorochrome (Calcein AM Fluorescent Dye, BD Biosciences) [377].

Plusieurs études ont démontré le rôle des SIgA anti-Env dans l'inhibition de la transcytose chez des sujets ESN notamment [2, 6, 300]. Nous souhaiterions évaluer la capacité de nos IgA1 à bloquer la transcytose dans un modèle cellulaire ou *in vivo* [378]. Une des fonctionnalités antivirales importantes de nos IgA1 à investiguer est leur capacité à médier l'ADCC ou l'ADCVI. En effet, des travaux [310, 350] ont démontré que chez des macaques immunisés par voie nasale ou rectale, la protection pouvait être apportée par des IgA muqueuses capables de médier l'ADCC ou l'ADCVI *in vivo* au niveau des muqueuses et dans le sérum.

D'autres études de caractérisation de ces anticorps et notamment de l'IgA1 F4.30 sont actuellement en cours. Nous souhaitons établir une collaboration avec le groupe de P. Kwong aux Etats-Unis, pour étudier la constitution du cristal entre le F4.30 et un trimère de la gp41 ou de la gp140 [355, 379]. A notre connaissance, ce serait le premier cristal d'une IgA complexée avec son antigène. Cette étude nous permettra d'approfondir notre connaissance sur la liaison et l'interaction de F4.30 à la gp41 et

connaître le comportement ainsi que la position spatiale des résidus impliqués dans la reconnaissance. Pour ce faire, une étape de séquençage des régions variables des chaînes lourdes et légères à partir des hybridomes d'intérêt est en cours en partenariat avec la société B Cell Design. Les régions variables de nos IgA1 seront ensuite greffées dans des vecteurs d'expression eucaryotes comprenant les parties constantes d'une IgG2 humaine. Cette technique permet, d'une part, d'obtenir des anticorps totalement humanisés mais aussi d'utiliser ces séquences pour simuler *in silico* les interactions des régions variables avec les acides aminés, les sucres et les chaînes latérales de la gp41 grâce à la cristallographie en 3D [380].

Les anticorps produits à l'aide de ce modèle murin humanisé sont caractérisés par une maturation B relativement normale en terme de taille des compartiments B, de réarrangements VDJ, de réarrangements de switch et d'hypermutations [356]. Ils présentent souvent de fortes affinités et sont intégrés dans des stratégies thérapeutiques comme pour le panitumumab [381-382] ou le rituximab [383-384]. Les anticorps que nous avons produits pourraient être facilement intégrés dans une stratégie thérapeutique protectrice par application topique au niveau des muqueuses dans un modèle de souris humanisées [385]. Plusieurs études démontrent l'intérêt de stratégies d'immunisation par voie muqueuses et leur intérêt dans la mise en place de réponses immunitaires basées sur les IgA. Plusieurs stratégies d'immunisation muqueuse chez les macaques qui donnent lieu à des réponses IgA muqueuses et systémiques ont été décrites [386-391]. Ces résultats mettent en lumière les nouvelles stratégies que nous pouvons élaborer pour améliorer l'efficacité de nos IgA1 ainsi que nos stratégies d'immunisation. D'autres stratégies peuvent consister en l'utilisation des IgA1 comme microbicides au niveau vaginal ou rectal en combinaison avec d'autres agents microbicides comme le tenofovir, par exemple. En effet, des travaux [392-393] ont permis de démontrer que l'anticorps b12 bloquait l'infection au niveau vaginal via son interaction avec le CCR5. Cependant, la demi-vie de cet anticorps était inférieure à 4h. Ces résultats démontrent la nécessité de greffer une pièce sécrétoire à nos IgA pour ce genre d'application car elles sont dégradées rapidement par les protéases au sein de la lumière muqueuse. Suite à ces résultats très intéressants, d'autres stratégies d'immunisations peuvent aussi être envisagées afin d'induire une production d'IgA au niveau muqueux. En effet, plusieurs approches de vaccination contre le VIH par voie nasale ont été évaluées. Des nanoparticules polymériques ont été utilisées en tant que système de délivrance d'un antigène VIH vaccinal par voie nasale. Il a été en effet rapporté que la vaccination par voie intranasale avec des nanoparticules contenant le VIH inactivés (nanoparticules de polystyrène) permettait d'induire une réponse IgA spécifique dans les lavages vaginaux des souris immunisées [394]. Une réponse en anticorps neutralisants a également été détectée dans les lavages vaginaux de souris immunisées par voie intranasale contre l'isolat IIIIB du VIH-1 [394]. Ainsi une immunisation des souris chimériques par nos cellules en combinaison avec des adjuvants capables d'induire une réponse muqueuse comme la toxine cholérique ou la molécule DC-Chol permettra l'induction d'une réponse locale vaginale et

l'obtention d'IgA sécrétoires neutralisantes. Les anticorps monoclonaux acquièrent leur puissance de neutralisation à partir de leur capacité à bloquer un site fonctionnel important et critique pour l'entrée virale comme dans les anticorps dirigés contre le site de liaison de CD4. L'ampleur et la puissance de nos IgA1 et notamment du F4.30 démontrent que le site conservé de la gp41 peut être un antigène cible important pour la neutralisation du VIH.

Discussions et perspectives

Discussions et perspectives

1) Objectifs de recherche et principaux résultats obtenus

L'objectif de mon travail de thèse était d'étudier la fonction des IgA dirigées contre la partie C-terminale de la gp41 du VIH-1 afin de pouvoir établir l'intérêt potentiel de ces anticorps muqueux. Nous avons choisi d'étudier la réponse dirigée contre la région MPER car peu d'études ciblent cette région de la glycoprotéine d'enveloppe. Nous avons voulu, dans un premier temps, étudier la prévalence et l'activité neutralisante des réponses IgA anti-MPER au niveau muqueux chez des individus ESN et la comparer à celle des patients VIH⁺. Cette première étude a clairement démontré l'intérêt potentiel des SIgA dirigées contre la gp41 et leur possible implication dans la protection anti-VIH. La deuxième partie de mon travail de thèse a été de produire *in vivo* des IgA neutralisantes dirigées contre la gp41 dans un modèle murin humanisé. Ces IgA ont été caractérisées pour leur capacité à reconnaître la gp41 ainsi que leurs propriétés antivirales.

Durant la première partie de ma thèse, nous avons pu démontrer que 100% des ESN de notre étude contre 58% des patients VIH⁺ présentaient des IgA anti-MPER. Ces IgA présentent des capacités neutralisantes très fortes contre l'infection *in vitro* par le SF162, même à de très faibles concentrations (de l'ordre du pg/ml). Ces résultats préliminaires ont confirmé le rôle neutralisant des SIgA anti-MPER chez les individus ESN et leur probable association à la protection de ses sujets vis-à-vis du VIH. Ces études nous ont permis de valider la gp41 comme immunogène de choix pour l'induction d'IgA neutralisantes. Nous avons pu confirmer la prévalence d'IgA anti-gp41 muqueuses dans une deuxième cohorte de femmes. En effet, nous avons pu démontrer que les lavages cervicovaginaux de ces patientes présentaient des SIgA capables de reconnaître uniquement la gp41 et non la gp120 ou la gp140.

Grâce à ces premiers résultats, nous avons voulu confirmer que la gp41 était un immunogène capable d'induire des réponses immunitaires neutralisantes anti-VIH. Nous avons immunisé des souris chimériques $\alpha 1\text{kl}$ capables de produire des IgA1 humanisées. Suite à l'immunisation de ces souris, nous avons pu obtenir 6 anticorps monoclonaux de type IgA1 dirigés contre la gp41. Ces anticorps présentaient une forte capacité de reconnaissance de la gp41 dans des conformations natives ainsi que de neutralisation des différentes souches de laboratoire et primaires du VIH testées. La caractérisation de ces anticorps monoclonaux a permis de montrer leur spécificité pour la région HR2 et les épitopes neutralisants présents sur le MPER, les épitopes du 2F5 et du 4E10. Cependant les épitopes reconnus sont plus larges que ceux du 2F5 et du 4E10 ce qui peut suggérer une reconnaissance de formes conformationnelles voir discontinues. Ces observations ont été confirmées par microscopie à immunofluorescence sur les lignées HEK293gp41^{MSD} puis en cytométrie de flux sur des cellules infectées par la souche LAI. Les IgA anti-MPER ont différents profils de neutralisation de l'infection par le VIH. Parmi ces anticorps, F4.30 est celui qui présentait le plus grand potentiel de neutralisation avec l'inhibition

de 56% des souches testées dont 80 % de souches classées Tier 2-3. Tandis que les autres IgA1 présentaient un pouvoir neutralisant plus faible sur les souches testées. L'étude approfondie des épitopes de neutralisation par mutation ponctuelle sur la séquence du MPER a permis d'observer que les IgA1 anti-MPER produites présentait toutes une sensibilité à la mutation du W⁶⁶⁶ et L⁶⁷⁰. Ces acides aminés sont cruciaux pour la neutralisation du 2F5. D'autres mutations importantes semblent être primordiales pour la neutralisation par des anticorps, notamment le D⁶⁷⁴ qui est un résidu central de l'épitope du 4E10 et correspond à la seule position de glycosylation présente sur le MPER. Une des particularités observées dans les anticorps anti-MPER est leur forte autoréactivité or lors de notre étude, seule l'IgA1 SC16C13 présente une forte polyspécificité alors que les autres IgA1 ne sont pas autoréactives.

2) Discussions et perspectives

Les anticorps jouent un rôle important dans les réponses immunitaires anti-VIH. En effet, la présence d'IgA au niveau des muqueuses peut prévenir la transmission et induire des réponses immunitaires locales visant à inhiber l'infection par les particules virales ainsi que par les cellules infectées. Cependant, ces anticorps doivent être capables de reconnaître des épitopes dits « neutralisants » pour protéger de l'infection. Mais une fois l'infection établie, ces anticorps doivent être capables d'interagir avec les antigènes présentés à la surface des cellules infectées afin d'éliminer les foyers initiaux et contrôler la propagation du virus dans les réservoirs du virus. Ces anticorps doivent être fonctionnels, neutralisants et capables de médier des activités de type ADCC ou ADCVI. Ainsi les anticorps à forte maturation et/ou capables d'initier des réponses cellulaires antivirales sont nécessaires pour la mise en place d'une immunité efficace contre l'infection par le VIH et contrôler la virémie.

Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence le rôle potentiel des IgA anti-MPER neutralisantes dans l'immunité des muqueuses chez des patients ESN. Ces résultats peuvent être associés ainsi que d'autres facteurs dans la protection de ces individus vis-à-vis du VIH. Nous souhaiterions pouvoir confirmer cette hypothèse dans d'autres cohortes comme les patients LTNP et les réponders de l'essai vaccinal RV144. Nous avons également montré l'intérêt prometteur de l'utilisation de la gp41 comme immunogène dans l'induction d'anticorps neutralisants muqueux capables d'inhiber l'infection *in vitro*. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a clairement démontré l'effet bénéfique ou néfaste des IgA anti-enveloppe dans le sérum et au niveau des muqueuses.

La compréhension des mécanismes innés ainsi que le rôle des antigènes dans l'orientation et le switch de classe des immunoglobulines sont nécessaires pour élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques protectrices. Grâce à nos résultats, nous avons pu démontrer l'intérêt potentiel que peut présenter la préexistence d'IgA muqueuses capables d'inhiber l'infection chez les sujets ESN. Les études de Bomsel

[300] et de Hasse [395] ont décrit l'importance des IgA chez des primates non humains notamment les IgA anti-gp41, et leurs rôles fonctionnels dans la protection contre l'infection. Lors d'une infection aiguë par le VIH, la réponse humorale apparaît trop tardivement pour pouvoir être efficace et contrôler la réplication [328].

Lors de l'exposition au virus, la durée de vulnérabilité du virus permettant aux anticorps d'agir pour inhiber sa progression est très courte. Ainsi, la présence d'anticorps ayant des fonctions antivirales avant l'exposition au virus semble être un moyen efficace pour établir une protection locale durable. L'analyse des réponses initiales des anticorps peut améliorer notre capacité à générer une réponse humorale durable pour prévenir la pénétration et la réplication du virus. Les travaux de Yates et al [325] montrent que dans 87% des cas de transmissions récentes chez l'homme, les anticorps présents au niveau des muqueuses sont dirigés contre la gp41 plutôt que contre la gp120. Dans cette étude il a été démontré que les IgA spécifiques de la gp41 atteignent un pic de concentration avant de baisser, laissant place à l'apparition des IgA anti-gp120 dans les compartiments muqueux et systémique. Les mécanismes à l'origine de cette sélection antigénique ne sont pas connus et doivent être explorés. Enfin, il a été démontré que les IgA anti-gp41 présentes dans les compartiments muqueux, présentent des demi-vies plus courtes que les IgA anti-gp41 systémiques. Il serait également important d'en étudier les raisons structurales (monomères, dimères ou sécrétaires) ou environnementales (dégradation muqueuse rapide). L'isotype des SIgA neutralisantes est également une question importante. En effet, certains isotypes peuvent être plus neutralisants que d'autres [300]. Nous souhaiterions étudier la prévalence de ces isotypes dans le sérum et les sécrétions chez ces patients.

Le rôle antiviral des IgA anti-VIH chez les individus ESN a été largement démontré. En effet, les SIgA anti-VIH dirigées contre l'enveloppe sont le plus souvent décrites comme étant capables d'inhiber l'infection *in vitro* ou la transcytose des particules virales au sein des cellules épithéliales [2, 5, 9, 345, 396]. Ces IgA ont été décrites comme étant dirigées contre la région gp41 [5, 69] ou contre la gp120 [8, 9]. Cependant les études décrivant leur activité sont plus rares et démontrent plutôt une inhibition de certaines fonctions des anticorps comme l'induction de l'ADCC [332, 397]. D'autres études décrivent l'induction d'activité de type ADCC dans le colostrum de femmes VIH⁺ [398].

Plusieurs perspectives s'offrent à notre étude. En effet, l'étude des réponses muqueuses et systémiques semble nécessaire chez les sujets ESN. La caractérisation des épitopes ciblés par les SIgA dans différents compartiments (sécrétions cervicovaginales, lait, sperme et salive) paraît très importante. Cette étude pourra être réalisée sur des cellules exprimant différentes régions de la gp41 comme la lignée HEK293gp41^{MSD} ainsi que sur d'autres lignées que nous avons développées durant mes travaux de thèse. En effet, nous avons pu construire différentes lignées cellulaires exprimant à leur surface la région MPER ou la région MPER et la région intracytoplasmique de deux clades différents (HXB2, clade B et

92BR025, clade C). Ces cellules permettront de présenter les épitopes d'intérêt présents sur la gp41 membranaire dans des conditions optimales. Les résultats de ce mapping permettront d'identifier les épitopes-clé ciblés durant les réponses IgA anti-VIH chez les sujets ESN. L'investigation des épitopes ciblés durant l'exposition au VIH doit être réalisée chez des personnes ayant été contaminées ou ayant un comportement à risque récent. En effet, l'étude des réponses IgA chez ces patients permettra d'identifier les épitopes ciblés lors d'une première exposition muqueuse.

Enfin, il serait important d'explorer plus précisément le potentiel cross-clade de ces IgA anti-VIH. En effet, la polyréactivité des IgA est clairement démontrée dans la littérature. Il semble probable que ces IgA soient capables de reconnaître différents clades de virus. Cette polyréactivité semble dépendante de la forte glycosylation de ces IgA [399 ; 398]. Il est notamment clairement établi que le profil de glycosylation et de sialylation des IgA1 et des IgA2 est très différent. Il me paraît donc important d'évaluer le profil de glycosylation de ces anticorps muqueux afin de corréler cette glycosylation à l'efficacité de protection. Il a déjà été démontré que la glycosylation des épitopes a un rôle majeur dans la reconnaissance du virus. Notre groupe a notamment démontré leur importance dans la reconnaissance de la région V1/V2 par des IgA de sujets ESN [400]. En effet, les travaux de V. Granados-Gonzales ont comparé la réactivité de SIgA de salives parotidiennes ainsi que des IgA et des IgG sériques de patients HIV⁺ vis-à-vis de protéines recombinantes représentant les boucles V1/V2 sous forme glycosylée et déglycosylée. Ces travaux ont pu montrer qu'en l'absence de glycosylation, la réactivité des SIgA vis-à-vis de ces protéines est augmentée alors qu'aucune variation de reconnaissance n'a pas été observée pour les IgA et les IgG sériques.

Dans notre laboratoire, nous avons également démontré que seules les IgA2 étaient capables de permettre la transcytose inverse au niveau des muqueuses monostratifiées. Cette différence fonctionnelle des isotopes IgA pourrait participer aux effets contrastés que peuvent avoir les IgA au niveau muqueux et sérique. Il est possible d'imaginer que certaines IgA sont capables de bloquer la pénétration du virus alors que d'autres favorisent plutôt sa transmission en lui permettant de traverser les muqueuses. Nous étudions actuellement l'effet des IgA muqueuses sur la transcytose de particules virales dans un modèle d'épithélium reconstruit.

Toutefois ces approches de caractérisation nécessitent de grande quantité d'anticorps. La rareté des individus ESN ainsi que les faibles concentrations des IgA au sein des prélèvements muqueux limitent ces tests de caractérisation. Il est donc nécessaire de pouvoir produire des IgA fonctionnelles *in vitro* afin de caractériser leurs propriétés antivirales.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons pu immuniser des souris $\alpha 1\text{KI}$ [357, 358, 401] capables de produire des IgA1 humanisées à forte affinité. Cette immunisation a été réalisée par une première injection d'ADN recombinant et des rappels avec la lignée cellulaire HEK293gp41^{MSD}. Ces

immunisations ont permis de produire des IgA1 dirigées contre les épitopes de la région MPER ELDKWA et WNFDIT. Ces IgA1 sont capables de neutraliser *in vitro* différentes souches de laboratoire et primaires du VIH. Cependant, ces souris ne produisent que des IgA1 chimériques humanisées et il est clairement démontré que les IgA1 et les IgA2 peuvent avoir des propriétés fonctionnelles distinctes. L'équipe de M. Cogné travaille actuellement sur le développement d'une lignée de souris transgénique humanisée permettant la production d'IgA2. Il serait très intéressant de comparer les répertoires obtenus dans ces deux types de lignées murines et d'analyser la fonctionnalité des anticorps obtenus. Cette équipe travaille également sur la possibilité de favoriser la production d'IgA dimériques et sécrétoires directement *in vivo*. Il serait également particulièrement pertinent de comparer les réponses obtenues dans ce dernier modèle. Enfin, les IgA1 produites lors de mon travail de thèse sont chimériques (souris/homme). Cette « humanisation » peut clairement modifier les propriétés de ces IgA. Nous avons démarré une étude visant à humaniser complètement l'anticorps F4.30 pour en comparer les propriétés avec la version chimérique. Cette modification pourrait avoir des répercussions sur son activité neutralisante mais aussi sur son absence de polyréactivité. Concernant les fonctionnalités antivirales des IgA1, nous étudions actuellement leur capacité d'inhibition du complexe de fusion *in vitro* par ELISA. Nous souhaitons également évaluer la capacité d'inhibition de l'infection cellule à cellule et la formation de syncytia par une technique de « Dye to dye transfer » (transfert de fluorochrome (Calcein AM Fluorescent Dye, BD Biosciences) [5, 69]. D'autres fonctionnalités antivirales déjà décrites dans la littérature comme l'inhibition de la transcytose à travers les cellules épithéliales pourraient également être évaluées. En effet, un test d'inhibition de la transcytose peut être envisagé en utilisant un modèle cellulaire épithélial *in vitro* déjà développé au sein de notre laboratoire [8, 9] ou des explants de tissu épithélial vaginal [332, 397]. Enfin l'étude de l'induction de l'ADCC et l'ADCVI *in vitro* peut être envisagée [398].

Concernant la stratégie d'immunisation, différentes études ont permis de produire des IgA muqueuses notamment l'immunisation intranasale ou orale suivie de rappels par voie intramusculaire [399]. Il a été rapporté, en effet, que la vaccination par voie intranasale avec des nanoparticules contenant du VIH inactivé (nanoparticules de polystyrène) permettait d'induire une réponse IgA spécifique dans les lavages vaginaux des souris immunisées [398]. Une réponse neutralisante a également été détectée dans les lavages vaginaux de souris immunisées par voie intranasale contre l'isolat III B du VIH-1 [400]. Une stratégie d'immunisation induisant une réponse SIgA2 au sein du tractus intestinal peut être une réelle perspective d'induction de l'immunité à base d'anticorps au sein du GALT puisque les cellules T CD4⁺ représentent un des principaux réservoirs viraux lors d'une infection par le VIH [357, 358, 401]. L'immunisation par voie orale pourrait s'avérer efficace car elle permet d'induire des IgA2 et des IgG au niveau intestinal [377].

Un des paramètres clé de l'immunité humorale est la réponse mémoire. Les cellules B circulantes sont des cellules différenciées qui sécrètent des anticorps en continu et ne nécessitent pas de stimulation antigénique. Par contre, les cellules B mémoire représentent une deuxième ligne de défense immunitaire qui est initiée par la présence d'anticorps préexistants même à de faibles concentrations.

Les cellules B mémoire humaines ont été largement décrites lors de l'infection par le VIH [378, 402]. Les récentes études de Walker et al [403] sur les cellules B mémoire de patients VIH⁺ ont permis la production de nouveaux anticorps neutralisants capables d'inhiber l'infection par la majorité des souches VIH circulantes. Les études de Brocca-Focano [331] ont aussi démontré l'induction des cellules sécrétrices d'anticorps IgA et IgG dirigés contre l'enveloppe suite à une immunisation avec de l'ADN recombinant SIV ou VIH et des immunisations par la protéine d'enveloppe SVIH. L'activité de ces anticorps anti-enveloppe a été corrélée à plusieurs fonctions comme l'ADCC, l'ADCVI et l'inhibition de la transcytose. Les cellules B mémoire à IgA et à IgG apparues après administration du virus ont été inversement corrélées avec la virémie chronique, indiquant que les cellules B mémoire induites par l'immunisation sont capables de prévenir l'infection. Ces résultats indiquent que, parmi les perspectives de notre étude, l'investigation des cellules B mémoire à IgA des patients VIH⁺ récemment exposés ou des ESN pourrait être particulièrement intéressante. Nous travaillons actuellement au développement d'une technique permettant le sous-clonage de ces cellules B mémoire à IgA à partir du sang de patients. Nous souhaiterions notamment sous-cloner les cellules B mémoire à tropisme muqueux.

D'autres études ont permis la production d'IgA *in vitro* en induisant un switch de classe grâce à des cytokines comme APRIL, BAFF, TGF β , TL1A, CD40L et l'IL-7. Leur utilisation pourrait permettre d'induire, dans les lymphocytes B naïfs, la commutation isotypique amenant à l'induction de plasmocytes à IgA [310]. Cette stratégie de production des IgA peut être aussi appliquée *in vivo* lors de l'immunisation des souris. Une étude a testé, après immunisation intranasale chez la souris, les effets adjuvants de ces cytokines avec l'antigène OVA, on observe une plus forte réponse immunitaire induite par les adjuvants APRIL, TL1A, et TNF- α qu'avec l'OVA seule. TL1A-OVA induit une réponse IgG et IgA spécifique de l'OVA dans les compartiments sérique et muqueux [394].

Durant ces dernières années, des anticorps monoclonaux IgG neutralisants à large spectre ont été décrits chez des patients VIH⁺ [394]. Ces anticorps neutralisants sont capables de neutraliser 90% des souches circulantes du VIH. Ces anticorps présentaient des taux de maturation d'affinité très élevés suggérant une longue maturation des lignées clonales. De plus, ces anticorps fortement neutralisants n'ont pu être produits que chez de rares patients VIH⁺ présentant des anticorps fortement neutralisants sans aucune corrélation clinique de protection [404]. Pour induire une réponse immunitaire neutralisante, il paraît nécessaire de déclencher un processus de maturation des cellules B en utilisant des immunogènes capables de se lier au

précurseurs des lignées clonales de cellules sécrétrices d'anticorps et d'initier leur processus de maturation. L'équipe de Schief [405] travaille actuellement sur le développement de nouvelles générations d'immunogènes qui ressemblent à des versions plus naturelles de l'enveloppe pouvant lier les AcMNL plus matures et donc guider leur maturation d'affinité vers les versions plus puissantes d'AcMNL. Ces équipes développent des domaines externes par ingénierie « engineering outer domain » qui seront ensuite insérés à la surface des VLnPs (Virus Like nanoParticules) qui pourront présenter jusqu'à 60 domaines différents à leur surface. L'utilisation de ces VLnPs chez des souris ou des macaques dont le gène VH a été remplacé par le gène VH1-2*02 spécifique de l'homme a permis la production, chez le singe et non chez la souris, d'anticorps similaires à 95.5% avec VRC01 issus de cette lignée germinale. Ces travaux démontrent la nécessité d'utiliser des immunogènes capables d'induire une maturation d'affinité dans les modèles animaux.

L'utilisation de nos IgA1 peut être intégrée dans différentes approches prophylactiques ou thérapeutiques. En effet, les IgA1 anti-MPER pourraient être utilisées dans des approches de sérothérapie/immunothérapie passive afin d'éviter une transmission virale. En effet, les anticorps neutralisants comme 2G12 et b12 administrés passivement, entraînent une protection lors d'une injection de SVIH dans certains modèles de singes. Les anticorps administrés par voie intraveineuse protègent également les macaques contre l'administration de SVIH (VIH/SIV) par voie intraveineuse et muqueuse. Cependant, l'administration de ces anticorps protège le macaque uniquement lors d'une contamination vaginale [228, 235, 406]. Le modèle de SVIH a été développé afin de mimer l'exposition de la muqueuse pendant la transmission du VIH [212, 215]. Il a été montré que les deux anticorps monoclonaux 2F5 et 4E10 confèrent une protection complète contre le SVIH chez le macaque. Chaque anticorps a été administré par voie intraveineuse à des groupes de six mâles macaques rhesus 1 jour avant et 1 jour après l'injection intra-rectale du SVIH (Bal). Dans ces groupes, cinq des six animaux ont montré une protection complète, et pour un macaque dans chaque groupe, une baisse de la réplication virale a été observée. Cette étude confirme le potentiel de protection des anticorps 2F5 et 4E10 [310].

L'administration systémique d'un cocktail d'anticorps F105, 2G12, 2F5 à 4 femelles macaques gravides ayant reçu au préalable une injection intraveineuse de SVIH-vpu a également été décrite. Celles-ci ont montré une protection contre le virus avant l'accouchement. Les nouveau-nés ont reçu oralement la même souche SVIH-vpu. Après six mois, aucune infection n'a été observée. Cette étude démontre que les trois anticorps monoclonaux sont essentiels pour obtenir une protection [407-408]. Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe en utilisant le virus SVIH89.96PD [409]. L'injection par voie intraveineuse des anticorps monoclonaux 2G12 et 2F5 [11, 142, 212, 227, 232]. Le 2G12 administré seul ou en association avec le 2F5 ne confère qu'une protection partielle (8 macaques sur 14) après injection par voie vaginale (virus SVIH X4 tropique). Cette étude présente un biais

important car le virus utilisé possède un tropisme dual R5-X4 avec une préférence pour le corécepteur X4 alors que les virus isolés lors d'une infection aiguë, ont un tropisme R5. De plus, les virus R5 sont généralement impliqués dans la transmission mère-enfant et l'absence d'expression de R5 est corrélée avec une forte protection contre l'infection par le VIH [15, 45].

L'ensemble de ces études démontre l'efficacité potentielle que peut avoir l'administration par voie systémique d'anticorps neutralisants pour prévenir l'infection. L'administration de nos IgA1 pourrait également limiter la réplication virale chez des patients infectés, au stade de la primo-infection. Ils pourraient notamment limiter l'accumulation du virus dans des réservoirs comme l'intestin. Cependant, pour cet usage, il serait nécessaire de greffer la pièce sécrétoire qui pourrait ainsi éviter la dégradation par les protéases présentes en grande quantité dans la lumière intestinale. L'utilisation locale de nos anticorps neutralisants capables de bloquer l'infection muqueuse du VIH-1 pourrait aussi conférer une protection efficace contre une infection virale [140, 217, 224, 410-413]. Parmi les approches envisagées, nous souhaiterions tester la capacité des IgA1 à bloquer la transmission d'un virus SVIH chez le macaque. Ces anticorps seront comparés ou combinés aux anticorps de référence tels que l'anticorps 2F5, 4E10 ou b12. Afin de faciliter l'application vaginale ou rectale de ces anticorps, ils seront formulés dans un gel afin d'en améliorer la persistance locale seuls ou en combinaison avec différents agents microbicides comme le tenofovir ou des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse comme les Diaryltriaazines et Diarylpyrimidines formulés en gel ou inclus dans des anneaux vaginaux [390, 414-415].

Il paraît indispensable d'humaniser et de stabiliser ces IgA. Le F4.30 est en cours de séquençage afin de cloner les VH et VL dans des plasmides d'expression d'immunoglobulines. Nous testerons l'efficacité de cet anticorps dans un contexte humanisé en IgG, IgA1 et IgA2. En fonction de l'isotype de l'anticorps, nous espérons ainsi améliorer l'efficacité *in vivo* de nos anticorps en facilitant notamment leur capacité à induire une réponse de type ADCC. Nous avons pu observer des différences d'affinité importante entre nos IgA1 et les IgG/IgA des anticorps 2F5 ou 4E10. En effet, les IgA1 semblent avoir une affinité/avidité supérieure aux IgG ce qui leur permettrait d'être bien plus efficaces *in vivo*.

Un vaccin efficace contre le VIH devrait être en mesure d'induire une immunité durable et d'empêcher l'apparition de l'infection et de réduire la réplication du virus chez les patients infectés afin de ralentir l'évolution de la maladie et de réduire le risque de contamination virale. Des études récentes ont montré que l'induction d'une immunité mucoale robuste, une forte activité des lymphocytes T polyfonctionnels et des anticorps neutralisants à large spectre sont des facteurs importants de l'immunité protectrice contre le VIH-1. La première étude clinique d'un vaccin contre le VIH a eu lieu aux États-Unis en 1987 pour tester un vaccin protéique basé sur la gp160. Depuis, plus de 40 candidats vaccins ont été testés dans plus de 80 essais cliniques de phase I / phase II, impliquant plus de 10 000 volontaires sains dans le monde. Les vaccins contre le VIH testés chez l'homme ont été conçus pour induire des anticorps

neutralisants, puis une réponse immunitaire cellulaire. Le rôle des anticorps neutralisants dans le confinement de la réplication virale chez les patients infectés semble être incertain et, dans la plupart des cas, les anticorps neutralisants ne protègent pas contre la progression de la maladie [391]. Cependant, les anticorps neutralisent le virus durant les premières étapes de l'infection prévenir ou retarder la progression vers le stade SIDA. La détection des anticorps neutralisants dépend des tests de mesure de la neutralisation utilisés *in vitro*, et la standardisation des tests est essentielle pour être en mesure de comparer l'ampleur et la qualité de la réponse des anticorps neutralisants dans le sérum et dans les sécrétions. Les mécanismes d'échappement viraux à la neutralisation présentent une forte variabilité et une importante glycosylation des protéines de l'enveloppe, la trimérisation de l'enveloppe et l'excrétion ainsi que l'exposition finale des domaines fonctionnels importants par des changements conformationnels induits à la suite à la liaison au CD4. La glycosylation de l'enveloppe est un inconvénient pour l'induction d'une réponse IgG neutralisante efficace. Cependant ceci peut s'avérer un avantage pour l'activité neutralisante des IgA. Enfin, des solutions pour améliorer l'accès des molécules neutralisantes telles que la chaîne lourde des anticorps ou Fab aux résidus cruciaux ou les régions clé peuvent être identifiées à partir des modèles animaux. Récemment, des anticorps composés d'une chaîne lourde unique ont été décrits. Ils semblent posséder des propriétés supérieures en terme de neutralisation comparées à des anticorps classiques [414]. Ces anticorps sont suffisamment petits pour intervenir lors de la formation de la synapse virale et donc inhibent les premières étapes cruciales de l'infection. D'autres espèces productrices d'anticorps avec les mêmes propriétés, comme les requins et les poissons cartilagineux [388-389, 416], pourraient apporter de nouveaux éclairages sur le développement de vaccins contre le VIH.

Les anticorps peuvent neutraliser le virus durant la première étape de l'infection et participent à l'induction de l'immunité adaptative contre le VIH pour prévenir ou retarder la progression de l'infection à VIH. Le développement d'un vaccin contre le VIH est un formidable défi scientifique compte tenu de l'extrême variabilité génétique du virus, le manque d'un bon modèle animal, le manque de connaissance de tous les mécanismes impliqués dans l'immunité et certaines limites dans les technologies récentes. Cependant, les données récentes semblent suggérer que la capacité d'un candidat vaccin à générer une réponse neutralisante à large spectre contre plusieurs épitopes dans la glycoprotéine Env sera d'une grande importance. Face à un mécanisme d'échappement très efficace, élaboré dans le seul but de contrecarrer et de contourner un éventail de stratégies immunitaires, il est essentiel d'être capable de faire la distinction entre l'immunogénicité et l'antigénicité. Les progrès récents dans le développement de nouveaux immunogènes ou de nouveaux anticorps neutralisants à large spectre et l'approfondissement de nos connaissances sur la structure des glycoprotéines de l'enveloppe et de leurs interactions avec les anticorps neutralisants peuvent permettre le développement et la conception d'un vaccin efficace capable de prévenir ou de ralentir l'infection et la progression vers le

SIDA. Dans cette optique, l'induction d'une réponse IgA muqueuse nous paraît être un critère important d'efficacité. Mon travail de thèse a permis de démontrer clairement le potentiel thérapeutique des IgA dirigées contre la gp41 et notamment leur supériorité en terme d'affinité de reconnaissance de l'enveloppe.

Références

Références

- [1]. Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, et al. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 1998; **9**:277-287.
- [2]. Tudor D, Derrien M, Diomede L, Drillet AS, Houimel M, Moog C, et al. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol* 2009; **2**:412-426.
- [3]. Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol* 2000; **165**:5170-5176.
- [4]. Devito C, Zuber B, Schroder U, Benthin R, Okuda K, Broliden K, et al. Intranasal HIV-1-gp160-DNA/gp41 peptide prime-boost immunization regimen in mice results in long-term HIV-1 neutralizing humoral mucosal and systemic immunity. *J Immunol* 2004; **173**:7078-7089.
- [5]. Clerici M, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, et al. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 2002; **16**:1731-1741.
- [6]. Devito C, Hinkula J, Kaul R, Kimani J, Kiama P, Lopalco L, et al. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **30**:413-420.
- [7]. Horton RE, Ball TB, Wachichi C, Jaoko W, Rutherford WJ, Mckinnon L, et al. Cervical HIV-specific IgA in a population of commercial sex workers correlates with repeated exposure but not resistance to HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; **25**:83-92.
- [8]. Granados-Gonzalez V, Piedrahita LD, Martinez-Gutierrez M, Lawrence P, Saoudin H, Zapata X, et al. Neutralizing inter-clade cross-reactivity of HIV-1 V1/V2-specific secretory immunoglobulin A in Colombian and French cohorts. *AIDS* 2009; **23**:2219-2222.
- [9]. Vincent N, Malvoisin E, Pozzetto B, Lucht F, Genin C. Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients. *AIDS* 2004; **18**:37-43.

- [10]. Cohen J. AIDS research. Novel antibody response may explain HIV vaccine success. *Science* 2011; **333**:1560.
- [11]. Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 2011; **477**:466-470.
- [12]. Uberla K. HIV vaccine development in the aftermath of the STEP study: re-focus on occult HIV infection? *PLoS Pathog* 2008; **4**:e1000114.
- [13]. Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:783-792.
- [14]. Pancera M, Majeed S, Ban YE, Chen L, Huang CC, Kong L, et al. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:1166-1171.
- [15]. Benjelloun F, Lawrence P, Verrier B, Genin C, Paul S. Role of human immunodeficiency virus type 1 envelope structure in the induction of broadly neutralizing antibodies. *J Virol* 2012; **86**:13152-13163.
- [16]. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220**:868-871.
- [17]. Alter HJ, Eichberg JW, Masur H, Saxinger WC, Gallo R, Macher AM, et al. Transmission of HTLV-III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. *Science* 1984; **226**:549-552.
- [18]. Arya SK, Gallo RC, Hahn BH, Shaw GM, Popovic M, Salahuddin SZ, et al. Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. *Science* 1984; **225**:927-930.
- [19]. Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med* 1984; **311**:1292-1297.
- [20]. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; **225**:840-842.
- [21]. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. What to call the AIDS virus? *Nature* 1986; **321**:10.

- [22]. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; **391**:594-597.
- [23]. Fomsgaard A, Muller-Trutwin MC, Diop O, Hansen J, Mathiot C, Corbet S, et al. Relation between phylogeny of African green monkey CD4 genes and their respective simian immunodeficiency virus genes. *J Med Primatol* 1997; **26**:120-128.
- [24]. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; **288**:1789-1796.
- [25]. Myers G, Maclnnes K, Korber B. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; **8**:373-386.
- [26]. Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, Marx PA, et al. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 2003; **300**:1713.
- [27]. Marx PA, Drucker EM, Schneider WH. The serial passage theory of HIV emergence. *Clin Infect Dis* 2011; **52**:421; author reply 421-2.
- [28]. Marx PA, Apetrei C, Drucker E. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol* 2004; **33**:220-226.
- [29]. Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, et al. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J* 2001; **15**:276-278.
- [30]. Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; **356**:867-876.
- [31]. Jonassen TO, Stene-Johansen K, Berg ES, Hungnes O, Lindboe CF, Froland SS, et al. Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 1997; **231**:43-47.
- [32]. Robbins KE, Lemey P, Pybus OG, Jaffe HW, Youngpairaj AS, Brown TM, et al. U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol* 2003; **77**:6359-6366.
- [33]. Travers SA, Clewley JP, Glynn JR, Fine PE, Crampin AC, Sibande F, et al. Timing and reconstruction of the most recent common ancestor of the subtype C clade of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2004; **78**:10501-10506.

[34]. Diapositives clés sur les données épidémiologiques. 2012.
<http://www.unaids.org>

[35]. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; **233**:343-346.

[36]. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; **397**:436-441.

[37]. Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* 2002; **57**:109-128.

[38]. Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003; **17**:2547-2560.

[39]. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009; **15**:871-872.

[40]. Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002; **83**:1253-1265.

[41]. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* 2007; **81**:10209-10219.

[42]. Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M. Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res* 2008; **134**:64-73.

[43]. Kuznetsov YG, Victoria JG, Robinson WE, Jr, McPherson A. Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes. *J Virol* 2003; **77**:11896-11909.

[44]. The Structural Biology of HIV. 2011;
http://www.rcsb.org/pdb/general_information/news_publications/newsletters/2011q1/outreach.html

[45]. Fahd Benjelloun, Christian Genin and Stephane Paul (2011). HIV-1 Glycoprotein Immunogenicity, Recent Translational Research in HIV/AIDS, Prof. Yi-Wei Tang (Ed.), ISBN: 978-953-307-719-2, InTech, DOI: 10.5772/23209. Available

from: <http://www.intechopen.com/books/recent-translational-research-in-hiv-aids/hiv-1-glycoprotein-immunogenicity>

[46]. Veronese FD, DeVico AL, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 1985; **229**:1402-1405.

[47]. Moulard M, Decroly E. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1469**:121-132.

[48]. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 1992; **360**:358-361.

[49]. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; **93**:681-684.

[50]. Roux KH, Taylor KA. AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol* 2007; **17**:244-252.

[51]. Briggs JA, Riches JD, Glass B, Bartonova V, Zanetti G, Krausslich HG. Structure and assembly of immature HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:11090-11095.

[52]. Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 2001; **276**:13433-13441.

[53]. Yang P, Ai LS, Huang SC, Li HF, Chan WE, Chang CW, et al. The cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 harbors lipid raft association determinants. *J Virol* 2010; **84**:59-75.

[54]. Cormier EG, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* 2002; **76**:8953-8957.

[55]. Lin G, Bertolotti-Ciarlet A, Haggarty B, Romano J, Nolan KM, Leslie GJ, et al. Replication-competent variants of human immunodeficiency virus type 2 lacking the V3 loop exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *J Virol* 2007; **81**:9956-9966.

[56]. Teixeira C, Gomes JR, Gomes P, Maurel F. Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *Eur J Med Chem* 2011; **46**:979-992.

- [57]. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; **393**:648-659.
- [58]. Pancera M. Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). *virologie* 2005; **9**:457-472.
- [59]. Sattentau QJ, McMichael AJ. New templates for HIV-1 antibody-based vaccine design. *F1000 Biol Rep* 2010; **2**:60.
- [60]. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; **312**:767-768.
- [61]. Fleury S, Lamarre D, Meloche S, Ryu SE, Cantin C, Hendrickson WA, et al. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 1991; **66**:1037-1049.
- [62]. Tachibana M, Siddiqi MA, Ikegami Y, Eshima K, Shirota-Someya Y, Tahara-Hanaoka S, et al. Coreceptor function of mutant human CD4 molecules without affinity to gp120 of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 2000; **275**:20288-20294.
- [63]. Zanetti G, Briggs JA, Grunewald K, Sattentau QJ, Fuller SD. Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog* 2006; **2**:e83.
- [64]. Zhu P, Liu J, Bess J, Jr, Chertova E, Lifson JD, Grise H, et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 2006; **441**:847-852.
- [65]. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**:787-820.
- [66]. Stantchev TS, Broder CC. Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**:219-243.
- [67]. Harouse JM, Collman RG, Gonzalez-Scarano F. Human immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfo-galactosyl ceramide-positive cell line. *J Virol* 1995; **69**:7383-7390.

- [68]. Fantini J, Hammache D, Delezay O, Yahy N, Andre-Barres C, Rico-Lattes I, et al. Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion and entry. *J Biol Chem* 1997; **272**:7245-7252.
- [69]. Alfsen A, Bomsel M. HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem* 2002; **277**:25649-25659.
- [70]. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; **387**:569-572.
- [71]. van der Goot FG, Harder T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 2001; **13**:89-97.
- [72]. Campbell SM, Crowe SM, Mak J. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol* 2001; **22**:217-227.
- [73]. Nehete PN, Vela EM, Hossain MM, Sarkar AK, Yahy N, Fantini J, et al. A post-CD4-binding step involving interaction of the V3 region of viral gp120 with host cell surface glycosphingolipids is common to entry and infection by diverse HIV-1 strains. *Antiviral Res* 2002; **56**:233-251.
- [74]. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 1998; **163**:19-34.
- [75]. Nguyen DG, Hildreth JE. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol* 2003; **33**:483-493.
- [76]. Saifuddin M, Hart ML, Gewurz H, Zhang Y, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 2000; **81**:949-955.
- [77]. Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EM, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol* 2004; **164**:145-155.
- [78]. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; **100**:575-585.
- [79]. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; **100**:587-597.

- [80]. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; **12**:71-81.
- [81]. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 2002; **3**:975-983.
- [82]. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 2008; **9**:301-309.
- [83]. Nawaz F, Cicala C, Van Ryk D, Block KE, Jelacic K, McNally JP, et al. The Genotype of Early-Transmitting HIV gp120s Promotes alpha(4)beta(7) -Reactivity, Revealing alpha(4)beta(7)/CD4 T cells As Key Targets in Mucosal Transmission. *PLoS Pathog* 2011; **7**:e1001301.
- [84]. Salzwedel K, West JT, Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol* 1999; **73**:2469-2480.
- [85]. Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E, Blumenthal R. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J Virol* 1999; **73**:6089-6092.
- [86]. Dwyer JJ, Hasan A, Wilson KL, White JM, Matthews TJ, Delmedico MK. The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N-terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for six-helix bundle formation. *Biochemistry* 2003; **42**:4945-4953.
- [87]. Johnson WE, Sauvron JM, Desrosiers RC. Conserved, N-linked carbohydrates of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are largely dispensable for viral replication. *J Virol* 2001; **75**:11426-11436.
- [88]. Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; **72**:54-84, table of contents.
- [89]. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; **89**:263-273.

- [90]. Durell SR, Martin I, Ruyschaert JM, Shai Y, Blumenthal R. What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review). *Mol Membr Biol* 1997; **14**:97-112.
- [91]. Pritsker M, Rucker J, Hoffman TL, Doms RW, Shai Y. Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry* 1999; **38**:11359-11371.
- [92]. Qiang W, Sun Y, Weliky DP. A strong correlation between fusogenicity and membrane insertion depth of the HIV fusion peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:15314-15319.
- [93]. Miller MD, Geleziunas R, Bianchi E, Lennard S, Hrin R, Zhang H, et al. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:14759-14764.
- [94]. Del Angel VD, Dupuis F, Moron JP, Callebaut I. Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**:1153-1160.
- [95]. Vanlandschoot P, Beirnaert E, Barrere B, Calder L, Millar B, Wharton S, et al. An antibody which binds to the membrane-proximal end of influenza virus haemagglutinin (H3 subtype) inhibits the low-pH-induced conformational change and cell-cell fusion but does not neutralize virus. *J Gen Virol* 1998; **79** (Pt 7):1781-1791.
- [96]. Delahunty MD, Rhee I, Freed EO, Bonifacino JS. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* 1996; **218**:94-102.
- [97]. Buzon V, Padros E, Cladera J. Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry* 2005; **44**:13354-13364.
- [98]. Gordon LM, Nisthal A, Lee AB, Eskandari S, Ruchala P, Jung CL, et al. Structural and functional properties of peptides based on the N-terminus of HIV-1 gp41 and the C-terminus of the amyloid-beta protein. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**:2127-2137.
- [99]. Zheng Z, Yang R, Bodner ML, Weliky DP. Conformational flexibility and strand arrangements of the membrane-associated HIV fusion peptide trimer probed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* 2006; **45**:12960-12975.

- [100]. Kamath S, Wong TC. Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophys J* 2002; **83**:135-143.
- [101]. Gordon LM, Mobley PW, Pilpa R, Sherman MA, Waring AJ. Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using (13)C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1559**:96-120.
- [102]. Pan C, Liu S, Jiang S. HIV-1 gp41 fusion intermediate: a target for HIV therapeutics. *J Formos Med Assoc* 2010; **109**:94-105.
- [103]. Bewley CA, Louis JM, Ghirlando R, Clore GM. Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J Biol Chem* 2002; **277**:14238-14245.
- [104]. Weiss RA. HIV and AIDS: looking ahead. *Nat Med* 2003; **9**:887-891.
- [105]. Markosyan RM, Leung MY, Cohen FS. The six-helix bundle of human immunodeficiency virus Env controls pore formation and enlargement and is initiated at residues proximal to the hairpin turn. *J Virol* 2009; **83**:10048-10057.
- [106]. Caffrey M, Braddock DT, Louis JM, Abu-Asab MA, Kingma D, Liotta L, et al. Biophysical characterization of gp41 aggregates suggests a model for the molecular mechanism of HIV-associated neurological damage and dementia. *J Biol Chem* 2000; **275**:19877-19882.
- [107]. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 2001; **75**:10892-10905.
- [108]. Veiga AS, Castanho MA. The influence of cholesterol on the interaction of HIV gp41 membrane proximal region-derived peptides with lipid bilayers. *FEBS J* 2007; **274**:5096-5104.
- [109]. Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 2012; **491**:406-412.
- [110]. Zwick MB, Burton DR. HIV-1 neutralization: mechanisms and relevance to vaccine design. *Curr HIV Res* 2007; **5**:608-624.

- [111]. Ofek G, Tang M, Sambor A, Katinger H, Mascola JR, Wyatt R, et al. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* 2004; **78**:10724-10737.
- [112]. Franquelim HG, Chiantia S, Veiga AS, Santos NC, Schwille P, Castanho MA. Anti-HIV-1 antibodies 2F5 and 4E10 interact differently with lipids to bind their epitopes. *AIDS* 2011; **25**:419-428.
- [113]. Sun ZY, Oh KJ, Kim M, Yu J, Brusica V, Song L, et al. HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane. *Immunity* 2008; **28**:52-63.
- [114]. Gangupomu VK, Abrams CF. All-atom models of the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 from metadynamics. *Biophys J* 2010; **99**:3438-3444.
- [115]. Shang L, Yue L, Hunter E. Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J Virol* 2008; **82**:5417-5428.
- [116]. Miyauchi K, Curran AR, Long Y, Kondo N, Iwamoto A, Engelman DM, et al. The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein. *Retrovirology* 2010; **7**:95.
- [117]. Miyauchi M, Shimai A, Tsuru Y. Photoinduced hydrophilicity of heteroepitaxially grown ZnO thin films. *J Phys Chem B* 2005; **109**:13307-13311.
- [118]. Yue L, Shang L, Hunter E. Truncation of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein defines elements required for fusion, incorporation, and infectivity. *J Virol* 2009; **83**:11588-11598.
- [119]. Owens RJ, Dubay JW, Hunter E, Compans RW. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:3987-3991.
- [120]. Owens RJ, Burke C, Rose JK. Mutations in the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein that affect fusion activity. *J Virol* 1994; **68**:570-574.
- [121]. Viard M, Ablan SD, Zhou M, Veenstra TD, Freed EO, Raviv Y, et al. Photoinduced reactivity of the HIV-1 envelope glycoprotein with a membrane-embedded probe reveals insertion of portions of the HIV-1 Gp41 cytoplasmic tail into the viral membrane. *Biochemistry* 2008; **47**:1977-1983.
- [122]. Gallaher WR. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 1987; **50**:327-328.

- [123]. Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1989; **5**:431-440.
- [124]. Cleveland SM, Jones TD, Dimmock NJ. Properties of a neutralizing antibody that recognizes a conformational form of epitope ERDRD in the gp41 C-terminal tail of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 2000; **81**:1251-1260.
- [125]. Cleveland SM, McLain L, Cheung L, Jones TD, Hollier M, Dimmock NJ. A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion. *J Gen Virol* 2003; **84**:591-602.
- [126]. McInerney TL, Brennan FR, Jones TD, Dimmock NJ. Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine* 1999; **17**:1359-1368.
- [127]. McLain L, Porta C, Lomonosoff GP, Durrani Z, Dimmock NJ. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies raised to a glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; **11**:327-334.
- [128]. McLain L, Durrani Z, Wisniewski LA, Porta C, Lomonosoff GP, Dimmock NJ. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine* 1996; **14**:799-810.
- [129]. McLain L, Brown JL, Cheung L, Reading SA, Parry C, Jones TD, et al. Different effects of a single amino acid substitution on three adjacent epitopes in the gp41 C-terminal tail of a neutralizing antibody escape mutant of human immunodeficiency virus type 1. *Arch Virol* 2001; **146**:157-166.
- [130]. Newton SM, Joys TM, Anderson SA, Kennedy RC, Hovi ME, Stocker BA. Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of a Salmonella live vaccine. *Res Microbiol* 1995; **146**:203-216.
- [131]. Reading SA, Heap CJ, Dimmock NJ. A novel monoclonal antibody specific to the C-terminal tail of the gp41 envelope transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1 that preferentially neutralizes virus after it has attached to the target cell and inhibits the production of infectious progeny. *Virology* 2003; **315**:362-372.
- [132]. Hollier MJ, Dimmock NJ. The C-terminal tail of the gp41 transmembrane envelope glycoprotein of HIV-1 clades A, B, C, and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure, and function. *Virology* 2005; **337**:284-296.

- [133]. Kennedy RC, Henkel RD, Pauletti D, Allan JS, Lee TH, Essex M, et al. Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope glycoprotein. *Science* 1986; **231**:1556-1559.
- [134]. Edwards TG, Wyss S, Reeves JD, Zolla-Pazner S, Hoxie JA, Doms RW, et al. Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 2002; **76**:2683-2691.
- [135]. Mulligan MJ, Yamshchikov GV, Ritter GD, Jr, Gao F, Jin MJ, Nail CD, et al. Cytoplasmic domain truncation enhances fusion activity by the exterior glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 2 in selected cell types. *J Virol* 1992; **66**:3971-3975.
- [136]. Wyss S, Dimitrov AS, Baribaud F, Edwards TG, Blumenthal R, Hoxie JA. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol* 2005; **79**:12231-12241.
- [137]. Dubay JW, Roberts SJ, Brody B, Hunter E. Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J Virol* 1992; **66**:4748-4756.
- [138]. Yu X, Yuan X, McLane MF, Lee TH, Essex M. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J Virol* 1993; **67**:213-221.
- [139]. Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 2008; **455**:109-113.
- [140]. Schief WR, Ban YE, Stamatatos L. Challenges for structure-based HIV vaccine design. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; **4**:431-440.
- [141]. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 2007; **445**:732-737.
- [142]. Walker LM, Burton DR. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr Opin Immunol* 2010; **22**:358-366.
- [143]. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:625-656.

- [144]. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; **407**:523-526.
- [145]. Abel K, Rocke DM, Chohan B, Fritts L, Miller CJ. Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2005; **79**:12164-12172.
- [146]. Reynolds MR, Rakasz E, Skinner PJ, White C, Abel K, Ma ZM, et al. CD8+ T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little. *J Virol* 2005; **79**:9228-9235.
- [147]. Karlsson AC, Lindback S, Gaines H, Sonnerborg A. Characterization of the viral population during primary HIV-1 infection. *AIDS* 1998; **12**:839-847.
- [148]. Richman DD. Introduction: challenges to finding a cure for HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2011; **6**:1-3.
- [149]. Korenromp EL, White RG, Orroth KK, Bakker R, Kamali A, Serwadda D, et al. Determinants of the impact of sexually transmitted infection treatment on prevention of HIV infection: a synthesis of evidence from the Mwanza, Rakai, and Masaka intervention trials. *J Infect Dis* 2005; **191 Suppl 1**:S168-78.
- [150]. Guimaraes MD, Vlahov D, Castilho EA. Postcoital vaginal bleeding as a risk factor for transmission of the human immunodeficiency virus in a heterosexual partner study in Brazil. Rio de Janeiro Heterosexual Study Group. *Arch Intern Med* 1997; **157**:1362-1368.
- [151]. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:447-457.
- [152]. Lawrence P, Portran D, Terrasse R, Palle S, Olivier T, Fantini J, et al. Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. *AIDS* 2012; **26**:785-796.
- [153]. Weiler AM, Li Q, Duan L, Kaizu M, Weisgrau KL, Friedrich TC, et al. Genital ulcers facilitate rapid viral entry and dissemination following intravaginal inoculation with cell-associated simian immunodeficiency virus SIMmac239. *J Virol* 2008; **82**:4154-4158.
- [154]. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* 2005; **73**:1253-1263.

- [155]. Philip Lawrence, Aline Zimmer, Stéphane Paul. **HIV-1 mucosal infection: mechanisms, consequences and vaccinal perspectives**. *RFL* 2009;.
- [156]. Hladik F, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* 2009; **6**:20-28.
- [157]. Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, et al. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:10362-10367.
- [158]. Biggs BA, Hewish M, Kent S, Hayes K, Crowe SM. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1995; **154**:6132-6139.
- [159]. Kedzierska K, Azzam R, Ellery P, Mak J, Jaworowski A, Crowe SM. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol* 2003; **26**:247-263.
- [160]. Herbein G, Coaquette A, Perez-Bercoff D, Pancino G. Macrophage activation and HIV infection: can the Trojan horse turn into a fortress? *Curr Mol Med* 2002; **2**:723-738.
- [161]. Aquaro S, Calio R, Balzarini J, Bellocchi MC, Garaci E, Perno CF. Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic virus reservoir. *Antiviral Res* 2002; **55**:209-225.
- [162]. Iwasaki A. Innate immune recognition of HIV-1. *Immunity* 2012; **37**:389-398.
- [163]. Silvin A, Manel N. Interactions between HIV-1 and innate immunity in dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 2013; **762**:183-200.
- [164]. Ahmad A, Ahmad R. HIV's evasion of host's NK cell response and novel ways of its countering and boosting anti-HIV immunity. *Curr HIV Res* 2003; **1**:295-307.
- [165]. Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Richert L, Godet J, Goldschmidt V, et al. APOBEC3G impairs the multimerization of the HIV-1 Vif protein in living cells. *J Virol* 2013;.
- [166]. Ohmine S, Sakuma R, Sakuma T, Thatava T, Takeuchi H, Ikeda Y. The antiviral spectra of TRIM5alpha orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS One* 2011; **6**:e16121.

- [167]. Pertel T, Hausmann S, Morger D, Zuger S, Guerra J, Lascano J, et al. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 2011; **472**:361-365.
- [168]. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, et al. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 2003; **302**:1056-1060.
- [169]. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, Egger M, Francis SC, van de Wijert JH, et al. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and HIV infection in women: individual participant data meta-analysis. *PLoS Med* 2011; **8**:e1000416.
- [170]. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006; **34**:599-608.
- [171]. Elmore SA. Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006; **34**:687-696.
- [172]. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; **307**:254-258.
- [173]. Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B, Paul S. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 2012; **30**:142-154.
- [174]. Phalipon A, Corthesy B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol* 2003; **24**:55-58.
- [175]. Wu Y. Chemokine control of HIV-1 infection: beyond a binding competition. *Retrovirology* 2010; **7**:86-4690-7-86.
- [176]. Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, et al. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 2002; **420**:678-682.
- [177]. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; **422**:307-312.
- [178]. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 2010; **329**:811-817.
- [179]. Parsons MS, Rouleau D, Routy JP, LeBlanc R, Grant MD, Bernard NF. Selection of human anti-HIV broadly neutralizing antibodies occurs within the context of frozen 1F7-idiotypic repertoire. *AIDS* 2011; **25**:1249-1264.

- [180]. Fischer W, Ganusov VV, Giorgi EE, Hraber PT, Keele BF, Leitner T, et al. Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 2010; **5**:e12303.
- [181]. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 2009; **206**:1253-1272.
- [182]. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:7552-7557.
- [183]. Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 2007; **204**:3027-3036.
- [184]. Alter G, Moody MA. The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J Infect Dis* 2010; **202 Suppl 2**:S315-22.
- [185]. Zolla-Pazner S, Cardozo T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**:527-535.
- [186]. Selvarajah S, Puffer B, Pantophlet R, Law M, Doms RW, Burton DR. Comparing antigenicity and immunogenicity of engineered gp120. *J Virol* 2005; **79**:12148-12163.
- [187]. Selvarajah S, Puffer BA, Lee FH, Zhu P, Li Y, Wyatt R, et al. Focused dampening of antibody response to the immunodominant variable loops by engineered soluble gp140. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; **24**:301-314.
- [188]. Law M, Cardoso RM, Wilson IA, Burton DR. Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J Virol* 2007; **81**:4272-4285.
- [189]. Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 2010; **329**:856-861.
- [190]. Saphire EO, Montero M, Menendez A, van Houten NE, Irving MB, Pantophlet R, et al. Structure of a high-affinity "mimotope" peptide bound to HIV-1-neutralizing antibody b12 explains its inability to elicit gp120 cross-reactive antibodies. *J Mol Biol* 2007; **369**:696-709.

- [191]. Li Y, Svehla K, Louder MK, Wycuff D, Phogat S, Tang M, et al. Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 2009; **83**:1045-1059.
- [192]. Davis KL, Gray ES, Moore PL, Decker JM, Salomon A, Montefiori DC, et al. High titer HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination. *Virology* 2009; **387**:414-426.
- [193]. Moore PL, Ranchobe N, Lambson BE, Gray ES, Cave E, Abrahams MR, et al. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog* 2009; **5**:e1000598.
- [194]. Gnann JW, Jr, Nelson JA, Oldstone MB. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1987; **61**:2639-2641.
- [195]. Palker TJ, Matthews TJ, Clark ME, Cianciolo GJ, Randall RR, Langlois AJ, et al. A conserved region at the COOH terminus of human immunodeficiency virus gp120 envelope protein contains an immunodominant epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:2479-2483.
- [196]. Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 2004; **78**:13232-13252.
- [197]. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; **21**:171-189.
- [198]. Labrijn AF, Poignard P, Raja A, Zwick MB, Delgado K, Franti M, et al. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2003; **77**:10557-10565.
- [199]. Reeves JD, Lee FH, Miamidian JL, Jabara CB, Juntilla MM, Doms RW. Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J Virol* 2005; **79**:4991-4999.
- [200]. Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, et al. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 2003; **300**:2065-2071.
- [201]. Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, et al. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type

1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol* 1995; **69**:6609-6617.

[202]. Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson IA, et al. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* 2002; **76**:7306-7321.

[203]. Huskens D, Van Laethem K, Vermeire K, Balzarini J, Schols D. Resistance of HIV-1 to the broadly HIV-1-neutralizing, anti-carbohydrate antibody 2G12. *Virology* 2007; **360**:294-304.

[204]. Platt EJ, Gomes MM, Kabat D. Kinetic mechanism for HIV-1 neutralization by antibody 2G12 entails reversible glycan binding that slows cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;.

[205]. Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, et al. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1996; **70**:1100-1108.

[206]. Klein JS, Webster A, Gnanapragasam PN, Galimidi RP, Bjorkman PJ. A dimeric form of the HIV-1 antibody 2G12 elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *AIDS* 2010; **24**:1633-1640.

[207]. Zwick MB, Parren PW, Saphire EO, Church S, Wang M, Scott JK, et al. Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 2003; **77**:5863-5876.

[208]. Burton DR, Hessel AJ, Keele BF, Klasse PJ, Ketas TA, Moldt B, et al. Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**:11181-11186.

[209]. Wen M, Arora R, Wang H, Liu L, Kimata JT, Zhou P. GPI-anchored single chain Fv--an effective way to capture transiently-exposed neutralization epitopes on HIV-1 envelope spike. *Retrovirology* 2010; **7**:79.

[210]. Prabakaran P, Gan J, Wu YQ, Zhang MY, Dimitrov DS, Ji X. Structural mimicry of CD4 by a cross-reactive HIV-1 neutralizing antibody with CDR-H2 and H3 containing unique motifs. *J Mol Biol* 2006; **357**:82-99.

- [211]. Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, et al. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:6913-6918.
- [212]. Corti D, Langedijk JP, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F, Fernandez-Rodriguez BM, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 2010; **5**:e8805.
- [213]. Seaman MS, Janes H, Hawkins N, Grandpre LE, Devoy C, Giri A, et al. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J Virol* 2010; **84**:1439-1452.
- [214]. Watkins JD, Siddappa NB, Lakhashe SK, Humbert M, Sholukh A, Hemashettar G, et al. An Anti-HIV-1 V3 Loop Antibody Fully Protects Cross-Clade and Elicits T-Cell Immunity in Macaques Mucosally Challenged with an R5 Clade C SHIV. *PLoS One* 2011; **6**:e18207.
- [215]. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 2009; **326**:285-289.
- [216]. Thenin S, Roch E, Samleerat T, Moreau T, Chaillon A, Moreau A, et al. Naturally occurring substitutions of conserved residues in HIV-1 variants of different clades are involved in PG9 and PG16 resistance to neutralization. *J Gen Virol* 2012;.
- [217]. McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien JP, Khayat R, et al. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 2011; **480**:336-343.
- [218]. Ringe R, Phogat S, Bhattacharya J. Subtle alteration of residues including N-linked glycans in V2 loop modulate HIV-1 neutralization by PG9 and PG16 monoclonal antibodies. *Virology* 2012; **426**:34-41.
- [219]. Sattentau QJ. Vaccinology: A sweet cleft in HIV's armour. *Nature* 2011; **480**:324-325.
- [220]. Doria-Rose NA, Klein RM, Daniels MG, O'Dell S, Nason M, Lapedes A, et al. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol* 2010; **84**:1631-1636.
- [221]. Haynes BF, Moody MA, Verkoczy L, Kelsoe G, Alam SM. Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis. *Hum Antibodies* 2005; **14**:59-67.

[222]. Verkoczy L, Diaz M, Holl TM, Ouyang YB, Bouton-Verville H, Alam SM, et al. Autoreactivity in an HIV-1 broadly reactive neutralizing antibody variable region heavy chain induces immunologic tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:181-186.

[223]. van Gils MJ, Bunnik EM, Burger JA, Jacob Y, Schweighardt B, Wrin T, et al. Rapid escape from preserved cross-reactive neutralizing humoral immunity without loss of viral fitness in HIV-1-infected progressors and long-term nonprogressors. *J Virol* 2010; **84**:3576-3585.

[224]. Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK, et al. A Potent and Broad Neutralizing Antibody Recognizes and Penetrates the HIV Glycan Shield. *Science* 2011;.

[225]. Wu X, Zhou T, Zhu J, Zhang B, Georgiev I, Wang C, et al. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 2011; **333**:1593-1602.

[226]. Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, Louder MK, et al. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* 2007; **13**:1032-1034.

[227]. Li Y, O'Dell S, Walker LM, Wu X, Guenaga J, Feng Y, et al. Mechanism of neutralization by the broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibody VRC01. *J Virol* 2011; **85**:8954-8967.

[228]. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 2009; **458**:636-640.

[229]. Tran EE, Borgnia MJ, Kuybeda O, Schauder DM, Bartesaghi A, Frank GA, et al. Structural Mechanism of Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein Activation. *PLoS Pathog* 2012; **8**:e1002797.

[230]. Falkowska E, Ramos A, Feng Y, Zhou T, Moquin S, Walker LM, et al. PG V04, an HIV-1 gp120 CD4 binding site antibody, is broad and potent in neutralization but does not induce conformational changes characteristic of CD4. *J Virol* 2012;.

[231]. Chen L, Kwon YD, Zhou T, Wu X, O'Dell S, Cavacini L, et al. Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* 2009; **326**:1123-1127.

[232]. Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TY, et al. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 2011; **333**:1633-1637.

- [233]. Diskin R, Scheid JF, Marcovecchio PM, West AP, Jr, Klein F, Gao H, et al. Increasing the Potency and Breadth of an HIV Antibody by Using Structure-Based Rational Design. *Science* 2011;.
- [234]. Simek MD, Rida W, Priddy FH, Pung P, Carrow E, Laufer DS, 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* 2009; **83**:7337-7348.
- [235]. Bonsignori M, Hwang KK, Chen X, Tsao CY, Morris L, Gray E, et al. Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors. *J Virol* 2011; **85**:9998-10009.
- [236]. Volpe JM, Cowell LG, Kepler TB. SoDA: implementation of a 3D alignment algorithm for inference of antigen receptor recombinations. *Bioinformatics* 2006; **22**:438-444.
- [237]. Davenport TM, Friend D, Ellingson K, Xu H, Caldwell Z, Sellhorn G, et al. Binding interactions between soluble HIV envelope glycoproteins and quaternary-structure-specific monoclonal antibodies PG9 and PG16. *J Virol* 2011; **85**:7095-7107.
- [238]. Bonsignori M, Montefiori DC, Wu X, Chen X, Hwang KK, Tsao CY, et al. Two Distinct Broadly Neutralizing Antibody Specificities of Different Clonal Lineages in a Single HIV-1-infected Donor: Implications for Vaccine Design. *J Virol* 2012;.
- [239]. Gorny MK, Xu JY, Gianakakos V, Karwowska S, Williams C, Sheppard HW, et al. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:3238-3242.
- [240]. Gorny MK, Stamatatos L, Volsky B, Revesz K, Williams C, Wang XH, et al. Identification of a new quaternary neutralizing epitope on human immunodeficiency virus type 1 virus particles. *J Virol* 2005; **79**:5232-5237.
- [241]. Changela A, Wu X, Yang Y, Zhang B, Zhu J, Nardone GA, et al. Crystal structure of human antibody 2909 reveals conserved features of quaternary structure-specific antibodies that potently neutralize HIV-1. *J Virol* 2011; **85**:2524-2535.
- [242]. Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, et al. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 2005; **308**:1906-1908.

[243]. Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 2009; **15**:866-870.

[244]. Balla-Jhagjhoorsingh SS, Willems B, Heyndrickx L, Vereecken K, Janssens W, et al. Characterization of Neutralizing Profiles in HIV-1 Infected Patients from whom the HJ16, HGN194 and HK20 mAbs were Obtained. *PLoS One* 2011; **6**:e25488.

[245]. Zhou Q, Hidajat R, Peng B, Venzon D, Aldrich MK, Richardson E, et al. Comparative evaluation of oral and intranasal priming with replication-competent adenovirus 5 host range mutant (Ad5hr)-simian immunodeficiency virus (SIV) recombinant vaccines on immunogenicity and protective efficacy against SIV(mac251). *Vaccine* 2007; **25**:8021-8035.

[246]. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 2005; **433**:834-841.

[247]. Sougrat R, Bartesaghi A, Lifson JD, Bennett AE, Bess JW, Zabransky DJ, et al. Electron tomography of the contact between T cells and SIV/HIV-1: implications for viral entry. *PLoS Pathog* 2007; **3**:e63.

[248]. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; **280**:1884-1888.

[249]. Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; **67**:6642-6647.

[250]. Nelson JD, Brunel FM, Jensen R, Crooks ET, Cardoso RM, Wang M, et al. An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *J Virol* 2007; **81**:4033-4043.

[251]. Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, et al. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; **17**:1757-1765.

[252]. Dimitrov AS, Jacobs A, Finnegan CM, Stiegler G, Katinger H, Blumenthal R. Exposure of the membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Biochemistry* 2007; **46**:1398-1401.

- [253]. Kim M, Qiao Z, Yu J, Montefiori D, Reinherz EL. Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine* 2007; **25**:5102-5114.
- [254]. Phogat S, Wyatt R. Rational modifications of HIV-1 envelope glycoproteins for immunogen design. *Curr Pharm Des* 2007; **13**:213-227.
- [255]. Luftig MA, Mattu M, Di Giovine P, Geleziunas R, Hrin R, Barbato G, et al. Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**:740-747.
- [256]. Sabin C, Corti D, Buzon V, Seaman MS, Lutje Hulsik D, Hinz A, et al. Crystal structure and size-dependent neutralization properties of HK20, a human monoclonal antibody binding to the highly conserved heptad repeat 1 of gp41. *PLoS Pathog* 2010; **6**:e1001195.
- [257]. Pountourios P, McPhee DA, Kemp BE. Antibody epitopes sensitive to the state of human immunodeficiency virus type 1 gp41 oligomerization map to a putative alpha-helical region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; **8**:2055-2062.
- [258]. Nelson JD, Kinkead H, Brunel FM, Leaman D, Jensen R, Louis JM, et al. Antibody elicited against the gp41 N-heptad repeat (NHR) coiled-coil can neutralize HIV-1 with modest potency but non-neutralizing antibodies also bind to NHR mimetics. *Virology* 2008; **377**:170-183.
- [259]. Gustchina E, Li M, Louis JM, Anderson DE, Lloyd J, Frisch C, et al. Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS Pathog* 2010; **6**:e1001182.
- [260]. Gustchina E, Louis JM, Lam SN, Bewley CA, Clore GM. A monoclonal Fab derived from a human nonimmune phage library reveals a new epitope on gp41 and neutralizes diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 2007; **81**:12946-12953.
- [261]. Liu S, Lu H, Niu J, Xu Y, Wu S, Jiang S. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem* 2005; **280**:11259-11273.
- [262]. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 1995; **2**:1075-1082.
- [263]. Munoz-Barroso I, Durell S, Sakaguchi K, Appella E, Blumenthal R. Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J Cell Biol* 1998; **140**:315-323.

- [264]. Shnaper S, Sackett K, Gallo SA, Blumenthal R, Shai Y. The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively. *J Biol Chem* 2004; **279**:18526-18534.
- [265]. Shu W, Liu J, Ji H, Radigen L, Jiang S, Lu M. Helical interactions in the HIV-1 gp41 core reveal structural basis for the inhibitory activity of gp41 peptides. *Biochemistry* 2000; **39**:1634-1642.
- [266]. Vincent N, Kone A, Chanut B, Lucht F, Genin C, Malvoisin E. Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* 2008; **22**:2075-2085.
- [267]. Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfellner W, Trkola A, Purtscher M, et al. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; **10**:359-369.
- [268]. Gray ES, Madiga MC, Moore PL, Mlisana K, Abdool Karim SS, Binley JM, et al. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol* 2009; **83**:11265-11274.
- [269]. Morris L, Chen X, Alam M, Tomaras G, Zhang R, Marshall DJ, et al. Isolation of a Human Anti-HIV gp41 Membrane Proximal Region Neutralizing Antibody by Antigen-Specific Single B Cell Sorting. *PLoS One* 2011; **6**:e23532.
- [270]. Bryson S, Julien JP, Hynes RC, Pai EF. Crystallographic definition of the epitope promiscuity of the broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5: vaccine design implications. *J Virol* 2009; **83**:11862-11875.
- [271]. Julien JP, Bryson S, Nieva JL, Pai EF. Structural details of HIV-1 recognition by the broadly neutralizing monoclonal antibody 2F5: epitope conformation, antigen-recognition loop mobility, and anion-binding site. *J Mol Biol* 2008; **384**:377-392.
- [272]. Braibant M, Brunet S, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Katinger H, et al. Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS* 2006; **20**:1923-1930.
- [273]. Muhlbacher M, Spruth M, Siegel F, Zangerle R, Dierich MP. Longitudinal study of antibody reactivity against HIV-1 envelope and a peptide representing a conserved site on Gp41 in HIV-1-infected patients. *Immunobiology* 1999; **200**:295-305.

- [274]. Li B, Decker JM, Johnson RW, Bibollet-Ruche F, Wei X, Mulenga J, et al. Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2006; **80**:5211-5218.
- [275]. Haynes BF, Montefiori DC. Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates. *Expert Rev Vaccines* 2006; **5**:579-595.
- [276]. Mascola JR, Frankel SS, Broderick K. HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. *AIDS* 2000; **14 Suppl 3**:S167-74.
- [277]. Tian Y, Ramesh CV, Ma X, Naqvi S, Patel T, Cenizal T, et al. Structure-affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J Pept Res* 2002; **59**:264-276.
- [278]. Menendez A, Chow KC, Pan OC, Scott JK. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J Mol Biol* 2004; **338**:311-327.
- [279]. Parker CE, Deterding LJ, Hager-Braun C, Binley JM, Schulke N, Katinger H, et al. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J Virol* 2001; **75**:10906-10911.
- [280]. Veiga AS, Castanho MA. The membranes' role in the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5 mode of action needs re-evaluation. *Antiviral Res* 2006; **71**:69-72.
- [281]. Verkoczy L, Chen Y, Bouton-Verville H, Zhang J, Diaz M, Hutchinson J, et al. Rescue of HIV-1 broad neutralizing antibody-expressing B cells in 2F5 VH x VL knockin mice reveals multiple tolerance controls. *J Immunol* 2011; **187**:3785-3797.
- [282]. Kobie JJ, Alcena DC, Zheng B, Bryk P, Mattiaccio JL, Brewer M, et al. 9G4 Autoreactivity Is Increased in HIV-Infected Patients and Correlates with HIV Broadly Neutralizing Serum Activity. *PLoS One* 2012; **7**:e35356.
- [283]. Hager-Braun C, Tomer KB. Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics* 2005; **2**:745-756.
- [284]. Lorizate M, Cruz A, Huarte N, Kunert R, Perez-Gil J, Nieva JL. Recognition and blocking of HIV-1 gp41 pre-transmembrane sequence by monoclonal 4E10 antibody in a Raft-like membrane environment. *J Biol Chem* 2006; **281**:39598-39606.

- [285]. Brunel FM, Zwick MB, Cardoso RM, Nelson JD, Wilson IA, Burton DR, et al. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J Virol* 2006; **80**:1680-1687.
- [286]. Joos B, Trkola A, Kuster H, Aceto L, Fischer M, Stiegler G, et al. Long-term multiple-dose pharmacokinetics of human monoclonal antibodies (MAbs) against human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**:1773-1779.
- [287]. Song L, Sun ZY, Coleman KE, Zwick MB, Gach JS, Wang JH, et al. Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies disrupt a hinge-related function of gp41 at the membrane interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:9057-9062.
- [288]. Zwick MB, Jensen R, Church S, Wang M, Stiegler G, Kunert R, et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* 2005; **79**:1252-1261.
- [289]. Hessel AJ, Poignard P, Hunter M, Hangartner L, Tehrani DM, Bleeker WK, et al. Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat Med* 2009; **15**:951-954.
- [290]. Hessel AJ, Rakasz EG, Poignard P, Hangartner L, Landucci G, Forthal DN, et al. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog* 2009; **5**:e1000433.
- [291]. Hessel AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CE, Beurskens FJ, Bakker JM, et al. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 2007; **449**:101-104.
- [292]. Mascola JR, Montefiori DC. The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010; **28**:413-444.
- [293]. Mascola JR. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 2002; **20**:1922-1925.
- [294]. Montefiori DC, Mascola JR. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr Opin HIV AIDS* 2009; **4**:347-351.
- [295]. de Souza MS, Ratto-Kim S, Chuenarom W, Schuetz A, Chantakulkij S, Nuntapinit B, et al. The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. *J Immunol* 2012; **188**:5166-5176.

- [296]. Binley JM, Ban YE, Crooks ET, Eggink D, Osawa K, Schief WR, et al. Role of complex carbohydrates in human immunodeficiency virus type 1 infection and resistance to antibody neutralization. *J Virol* 2010; **84**:5637-5655.
- [297]. Frey G, Peng H, Rits-Volloch S, Morelli M, Cheng Y, Chen B. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:3739-3744.
- [298]. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:4144-4149.
- [299]. Gilbert P, Wang M, Wrin T, Petropoulos C, Gurwith M, Sinangil F, et al. Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. *J Infect Dis* 2010; **202**:595-605.
- [300]. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 2011; **34**:269-280.
- [301]. Granados-Gonzalez V, Piedrahita LD, Martinez M, Genin C, Riffard S, Urcuqui-Inchima S. Role of the HIV-1 gp120 V1/V2 domains in the induction of neutralizing antibodies]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; **27**:523-530.
- [302]. Pakkanen SH, Kantele JM, Moldoveanu Z, Hedges S, Hakkinen M, Mestecky J, et al. Expression of homing receptors on IgA1 and IgA2 plasmablasts in blood reflects differential distribution of IgA1 and IgA2 in various body fluids. *Clin Vaccine Immunol* 2010; **17**:393-401.
- [303]. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011; **4**:590-597.
- [304]. Bemark M, Boysen P, Lycke NY. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2012; **1247**:97-116.
- [305]. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**:592-605.
- [306]. Bonner A, Perrier C, Corthesy B, Perkins SJ. Solution structure of human secretory component and implications for biological function. *J Biol Chem* 2007; **282**:16969-16980.
- [307]. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol* 2011; **4**:590-597.

- [308]. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:822-829.
- [309]. Johansen FE, Brandtzaeg P. Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends Immunol* 2004; **25**:150-157.
- [310]. Brocca-Cofano E, McKinnon K, Demberg T, Venzon D, Hidajat R, Xiao P, et al. Vaccine-elicited SIV and HIV envelope-specific IgA and IgG memory B cells in rhesus macaque peripheral blood correlate with functional antibody responses and reduced viremia. *Vaccine* 2011; **29**:3310-3319.
- [311]. 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* 2012; **8**:e1002739.
- [312]. Wright A, Yan H, Lamm ME, Huang YT. Immunoglobulin A antibodies against internal HIV-1 proteins neutralize HIV-1 replication inside epithelial cells. *Virology* 2006; **356**:165-170.
- [313]. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999; **13**:23-29.
- [314]. Devito C, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *AIDS* 2000; **14**:1917-1920.
- [315]. Lo Caputo S, Trabattoni D, Vichi F, Piconi S, Lopalco L, Villa ML, et al. Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS* 2003; **17**:531-539.
- [316]. Hirbod T, Broliden K. Mucosal immune responses in the genital tract of HIV-1-exposed uninfected women. *J Intern Med* 2007; **262**:44-58.
- [317]. Mestecky J. Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. *J Reprod Immunol* 2007; **73**:86-97.
- [318]. Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F, Lo Caputo S, Veas F, Clerici M, et al. The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 2009; **23**:161-175.

- [319]. Hasselrot K, Bratt G, Hirbod T, Saberg P, Ehnlund M, Lopalco L, et al. Orally exposed uninfected individuals have systemic anti-HIV responses associating with partners' viral load. *AIDS* 2010; **24**:35-43.
- [320]. Hasselrot K, Bratt G, Duvefelt K, Hirbod T, Sandstrom E, Broliden K. HIV-1 exposed uninfected men who have sex with men have increased levels of salivary CC-chemokines associated with sexual behavior. *AIDS* 2010; **24**:1569-1575.
- [321]. Planque SA, Mitsuda Y, Nishiyama Y, Karle S, Boivin S, Salas M, et al. Antibodies to a Superantigenic Glycoprotein 120 Epitope as the Basis for Developing an HIV Vaccine. *J Immunol* 2012; **189**:5367-5381.
- [322]. Planque S, Nishiyama Y, Taguchi H, Salas M, Hanson C, Paul S. Catalytic antibodies to HIV: physiological role and potential clinical utility. *Autoimmun Rev* 2008; **7**:473-479.
- [323]. Planque S, Mitsuda Y, Taguchi H, Salas M, Morris MK, Nishiyama Y, et al. Characterization of gp120 hydrolysis by IgA antibodies from humans without HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; **23**:1541-1554.
- [324]. Moja P, Tranchat C, Tchou I, Pozzetto B, Lucht F, Desgranges C, et al. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mediated by parotid IgA of HIV-1-infected patients. *J Infect Dis* 2000; **181**:1607-1613.
- [325]. Yates NL, Stacey AR, Nolen TL, Vandergrift NA, Moody MA, Montefiori DC, et al. HIV-1 gp41 envelope IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life. *Mucosal Immunol* 2013;.
- [326]. Pastori C, Barassi C, Piconi S, Longhi R, Villa ML, Siccardi AG, et al. HIV neutralizing IgA in exposed seronegative subjects recognise an epitope within the gp41 coiled-coil pocket. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; **14**:15-21.
- [327]. Denner J, Eschricht M, Lauck M, Semaan M, Schlaermann P, Ryu H, et al. Modulation of cytokine release and gene expression by the immunosuppressive domain of gp41 of HIV-1. *PLoS One* 2013; **8**:e55199.
- [328]. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**:11-23.
- [329]. Liao HX, Chen X, Munshaw S, Zhang R, Marshall DJ, Vandergrift N, et al. Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated. *J Exp Med* 2011; **208**:2237-2249.

[330]. Fouda GG, Yates NL, Pollara J, Shen X, Overman GR, Mahlokozera T, et al. HIV-specific functional antibody responses in breast milk mirror those in plasma and are primarily mediated by IgG antibodies. *J Virol* 2011; **85**:9555-9567.

[331]. Tudor D, Bomsel M. The broadly neutralizing HIV-1 IgG 2F5 elicits gp41-specific antibody-dependent cell cytotoxicity in a FcγRI-dependent manner. *AIDS* 2011; **25**:751-759.

[332]. Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, Alam SM, Liao HX, Pollara J, et al. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;.

[333]. Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, Alpert MD, Chen X, Hwang KK, et al. ADCC-Mediating Antibodies from an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial Target Multiple Epitopes and Preferentially Use the VH1 Gene Family. *J Virol* 2012;.

[334]. Xu R, Srivastava IK, Kuller L, Zarkikh I, Kraft Z, Fagrouch Z, et al. Immunization with HIV-1 SF162-derived Envelope gp140 proteins does not protect macaques from heterologous simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection. *Virology* 2006; **349**:276-289.

[335]. Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, et al. Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:1030-1035.

[336]. Genesca M, McChesney MB, Miller CJ. Antiviral CD8+ T cells in the genital tract control viral replication and delay progression to AIDS after vaginal SIV challenge in rhesus macaques immunized with virulence attenuated SHIV 89.6. *J Intern Med* 2009; **265**:67-77.

[337]. Girard MP. Development of an AIDS vaccine: status report. *Med Trop (Mars)* 2007; **67**:340-346.

[338]. McEnery R. HVTN 505 trial expanded to see if vaccine candidates can block HIV acquisition. *IAVI Rep* 2011; **15**:17.

[339]. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 2012; **366**:1275-1286.

[340]. Barnett SW, Burke B, Sun Y, Kan E, Legg H, Lian Y, et al. Antibody-mediated protection against mucosal simian-human immunodeficiency virus challenge of macaques immunized with alphavirus replicon particles and boosted with trimeric envelope glycoprotein in MF59 adjuvant. *J Virol* 2010; **84**:5975-5985.

- [341]. Faggioni A, Corradini C, Venanzoni M, Cardi G, Bevere F, Barile G, et al. Nasopharyngeal carcinoma: the diagnostic value of the antibody-dependent, cellular cytotoxicity test and of EBV serology. *J Exp Pathol* 1987; **3**:471-477.
- [342]. Tudor D, Yu H, Maupetit J, Drillet AS, Bouceba T, Schwartz-Cornil I, et al. Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**:12680-12685.
- [343]. Pritsch O, Magnac C, Dumas G, Bouvet JP, Alzari P, Dighiero G. Can isotype switch modulate antigen-binding affinity and influence clonal selection? *Eur J Immunol* 2000; **30**:3387-3395.
- [344]. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000; **6**:207-210.
- [345]. Choi RY, Levinson P, Guthrie BL, Lohman-Payne B, Bosire R, Liu AY, et al. Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples. *AIDS* 2012; **26**:2155-2163.
- [346]. Hessel AJ, Haigwood NL. Neutralizing antibodies and control of HIV: moves and countermoves. *Curr HIV/AIDS Rep* 2012; **9**:64-72.
- [347]. Leroux-Roels G, Maes C, Clement F, van Engelenburg F, van den Dobbelen M, Adler M, et al. Randomized phase i: safety, immunogenicity and mucosal antiviral activity in young healthy women vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 peptide on virosomes. *PLoS One* 2013; **8**:e55438.
- [348]. Munier CM, Andersen CR, Kelleher AD. HIV vaccines: progress to date. *Drugs* 2011; **71**:387-414.
- [349]. Pastori C, Tudor D, Diomede L, Drillet AS, Jegerlehner A, Rohn TA, et al. Virus like particle based strategy to elicit HIV-protective antibodies to the alpha-helic regions of gp41. *Virology* 2012; **431**:1-11.
- [350]. Alfsen A, Iniguez P, Bouguyon E, Bomsel M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 2001; **166**:6257-6265.
- [351]. Mestecky J, Wright PF, Lopalco L, Staats HF, Kozlowski PA, Moldoveanu Z, et al. Scarcity or absence of humoral immune responses in the plasma and

cervicovaginal lavage fluids of heavily HIV-1-exposed but persistently seronegative women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; **27**:469-486.

[352]. Trabattoni D, Biasin M, Clerici M. Mucosal immunoglobulin A in HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 2012; **26**:2247-2250.

[353]. Kulkarni PS, Butera ST, Duerr AC. Resistance to HIV-1 infection: lessons learned from studies of highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals. *AIDS Rev* 2003; **5**:87-103.

[354]. Wu X, Changela A, O'Dell S, Schmidt SD, Pancera M, Yang Y, et al. Immunotypes of a Quaternary Site of HIV-1 Vulnerability and Their Recognition by Antibodies. *J Virol* 2011;.

[355]. Pancera M, Shahzad-UI-Hussan S, Doria-Rose NA, McLellan JS, Bailer RT, Dai K, et al. Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1-neutralizing V1-V2-directed antibody PG16. *Nat Struct Mol Biol* 2013;.

[356]. Cogné M, Le Morvan C, Sirac C. Mammifère non-humain transgénique pour la région constante de la chaîne lourde des IgA humaines et ses applications (monoclonaux humanisés à destinée muqueuse). 2005;.

[357]. Duchez S, Amin R, Cogne N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, et al. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:3064-3069.

[358]. Cogne M, Duchez S, Pascal V. Transgenesis and humanization of murine antibodies. *Med Sci (Paris)* 2009; **25**:1149-1154.

[359]. Broliden K, Hinkula J, Devito C, Kiama P, Kimani J, Trabbattoni D, et al. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol Lett* 2001; **79**:29-36.

[360]. Mazzoli S, Lopalco L, Salvi A, Trabattoni D, Lo Caputo S, Semplici F, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis* 1999; **180**:871-875.

[361]. Wright A, Lamm ME, Huang YT. Excretion of human immunodeficiency virus type 1 through polarized epithelium by immunoglobulin A. *J Virol* 2008; **82**:11526-11535.

- [362]. Hocini H, Belec L, Iscaki S, Garin B, Pillot J, Becquart P, et al. High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; **13**:1179-1185.
- [363]. Belec L, Ghys PD, Hocini H, Nkengasong JN, Tranchot-Diallo J, Diallo MO, et al. Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis* 2001; **184**:1412-1422.
- [364]. Nguyen M, Pean P, Lopalco L, Nouhin J, Phoung V, Ly N, et al. HIV-specific antibodies but not t-cell responses are associated with protection in seronegative partners of HIV-1-infected individuals in Cambodia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **42**:412-419.
- [365]. Kaul R, Plummer F, Clerici M, Bomsel M, Lopalco L, Broliden K. Mucosal IgA in exposed, uninfected subjects: evidence for a role in protection against HIV infection. *AIDS* 2001; **15**:431-432.
- [366]. Matsuda S, Noda M. Detection of IgA-binding sites on human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoproteins, Gp120 and Gp41. *Microbiol Immunol* 2000; **44**:923-929.
- [367]. Nishiyama Y, Karle S, Planque S, Taguchi H, Paul S. Antibodies to the superantigenic site of HIV-1 gp120: hydrolytic and binding activities of the light chain subunit. *Mol Immunol* 2007; **44**:2707-2718.
- [368]. Planque S, Salas M, Mitsuda Y, Sienczyk M, Escobar MA, Mooney JP, et al. Neutralization of genetically diverse HIV-1 strains by IgA antibodies to the gp120-CD4-binding site from long-term survivors of HIV infection. *AIDS* 2010; **24**:875-884.
- [369]. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009; **6**:15-25.
- [370]. Dorrell L, Hessel AJ, Wang M, Whittle H, Sabally S, Rowland-Jones S, et al. Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia. *AIDS* 2000; **14**:1117-1122.
- [371]. Ofek G, Guenaga FJ, Schief WR, Skinner J, Baker D, Wyatt R, et al. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:17880-17887.
- [372]. Song YK, Liu F, Zhang G, Liu D. Hydrodynamics-based transfection: simple and efficient method for introducing and expressing transgenes in animals by intravenous injection of DNA. *Methods Enzymol* 2002; **346**:92-105.

- [373]. Dawood R, Benjelloun F, Pin JJ, Kone A, Chanut B, Jospin F, et al. **Generation of HIV-1 potent and broad neutralizing antibodies by immunization with postfusion HR1/HR2 complex.** *AIDS* 2013; **27(5)**:717-730.
- [374]. Tomaras GD, Binley JM, Gray ES, Crooks ET, Osawa K, Moore PL, et al. Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. *J Virol* 2011; **85**:11502-11519.
- [375]. Gray ES, Meyers T, Gray G, Montefiori DC, Morris L. Insensitivity of paediatric HIV-1 subtype C viruses to broadly neutralising monoclonal antibodies raised against subtype B. *PLoS Med* 2006; **3**:e255.
- [376]. Pan C, Liu S, Jiang S. HIV-1 gp41 fusion intermediate: a target for HIV therapeutics. *J Formos Med Assoc* 2010; **109**:94-105.
- [377]. Takata K, Tomiyama Y, Tanaka K, Oshita S. Cardioprotective effects of hyperkalemia during simulated ischemia/reperfusion in neonatal rat cardiomyocytes-Preservation of Na(+)/K(+)-ATPase activity-. *J Med Invest* 2013; **60**:66-76.
- [378]. Sivard P, Berlier W, Picard B, Sabido O, Genin C, Misery L. HIV-1 infection of Langerhans cells in a reconstructed vaginal mucosa. *J Infect Dis* 2004; **190**:227-235.
- [379]. Acharya P, Luongo TS, Louder MK, McKee K, Yang Y, Do Kwon Y, et al. Structural Basis for Highly Effective HIV-1 Neutralization by CD4-Mimetic Miniproteins Revealed by 1.5 Å Cocystal Structure of gp120 and M48U1. *Structure* 2013;.
- [380]. Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. Rational Design of Vaccines to Elicit Broadly Neutralizing Antibodies to HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; **1**:a007278.
- [381]. Foon KA, Yang XD, Weiner LM, Beldegrun AS, Figlin RA, Crawford J, et al. Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **58**:984-990.
- [382]. Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, et al. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2004; **22**:3003-3015.
- [383]. Aviv A, Tadmor T, Polliack A. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: looking at pathogenesis, clinical issues and therapeutic options. *Ann Oncol* 2013;.

- [384]. Cervetti G, Galimberti S, Pelosini M, Ghio F, Cecconi N, Petrini M. Significant efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine{+/-} rituximab in the treatment of splenic marginal zone lymphoma (SMZL): extended follow-up. *Ann Oncol* 2013;.
- [385]. Klein F, Halper-Stromberg A, Horwitz JA, Gruell H, Scheid JF, Bournazos S, et al. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature* 2012; **492**:118-122.
- [386]. Mascola JR. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 2002; **20**:1922-1925.
- [387]. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000; **6**:207-210.
- [388]. Ferrantelli F, Rasmussen RA, Buckley KA, Li PL, Wang T, Montefiori DC, et al. Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 2004; **189**:2167-2173.
- [389]. Ruprecht RM, Ferrantelli F, Kitabwalla M, Xu W, McClure HM. Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine* 2003; **21**:3370-3373.
- [390]. Ruprecht RM. Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies against HIV-1 in macaque models: experimental approaches. *Methods Mol Biol* 2009; **525**:559-66, xiv.
- [391]. Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Xu W, Ayehunie S, et al. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 2000; **6**:200-206.
- [392]. Veazey RS. Animal models for microbicide safety and efficacy testing. *Curr Opin HIV AIDS* 2013;.
- [393]. Veazey RS, Ketas TJ, Dufour J, Moroney-Rasmussen T, Green LC, Klasse PJ, et al. Protection of rhesus macaques from vaginal infection by vaginally delivered maraviroc, an inhibitor of HIV-1 entry via the CCR5 co-receptor. *J Infect Dis* 2010; **202**:739-744.
- [394]. Akagi T, Kawamura M, Ueno M, Hiraishi K, Adachi M, Serizawa T, et al. Mucosal immunization with inactivated HIV-1-capturing nanospheres induces a significant HIV-1-specific vaginal antibody response in mice. *J Med Virol* 2003; **69**:163-172.

[395]. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 2010; **464**:217-223.

[396]. Farquhar C, VanCott T, Bosire R, Bermudez C, Mbori-Ngacha D, Lohman-Payne B, et al. Salivary human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific immunoglobulin A in HIV-1-exposed infants in Kenya. *Clin Exp Immunol* 2008; **153**:37-43.

[397]. Komiyama K, Crago SS, Itoh K, Moro I, Mestecky J. Inhibition of natural killer cell activity by IgA. *Cell Immunol* 1986; **101**:143-155.

[398]. Black KP, Cummins JE, Jr, Jackson S. Serum and secretory IgA from HIV-infected individuals mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; **81**:182-190.

[399]. Dimitrov JD, Pashov AD, Vassilev TL. Antibody polyspecificity: what does it matter? *Adv Exp Med Biol* 2012; **750**:213-226.

[400]. Granados-Gonzalez V, Claret J, Berlier W, Vincent N, Urcuqui-Inchima S, Lucht F, et al. Opposite immune reactivity of serum IgG and secretory IgA to conformational recombinant proteins mimicking V1/V2 domains of three different HIV type 1 subtypes depending on glycosylation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; **24**:289-299.

[401]. Laffleur B, Pascal V, Sirac C, Cogne M. Production of human or humanized antibodies in mice. *Methods Mol Biol* 2012; **901**:149-159.

[402]. Berlier W, Bourlet T, Lawrence P, Hamzeh H, Lambert C, Genin C, et al. Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J Med Virol* 2005; **77**:465-474.

[403]. 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.

[404]. Mestecky J, Moldoveanu Z, Smith PD, Hel Z, Alexander RC. Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *J Reprod Immunol* 2009; **83**:196-200.

[405]. Tana, Watarai S, Isogai E, Oguma K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett Appl Microbiol* 2003; **36**:135-139.

- [406]. Bonsignori M, Moody MA, Parks RJ, Holl TM, Kelsoe G, Hicks CB, et al. HIV-1 envelope induces memory B cell responses that correlate with plasma antibody levels after envelope gp120 protein vaccination or HIV-1 infection. *J Immunol* 2009; **183**:2708-2717.
- [407]. Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B, et al. Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1238**:132-144.
- [408]. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:421-434.
- [409]. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, et al. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **384**:296-300.
- [410]. Azoitei ML, Ban YE, Julien JP, Bryson S, Schroeter A, Kalyuzhniy O, et al. Computational design of high-affinity epitope scaffolds by backbone grafting of a linear epitope. *J Mol Biol* 2012; **415**:175-192.
- [411]. Azoitei ML, Correia BE, Ban YE, Carrico C, Kalyuzhniy O, Chen L, et al. Computation-guided backbone grafting of a discontinuous motif onto a protein scaffold. *Science* 2011; **334**:373-376.
- [412]. Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, Butera ST, Crotty S, Godzik A, et al. A Blueprint for HIV Vaccine Discovery. *Cell Host Microbe* 2012; **12**:396-407.
- [413]. Jardine J, Julien JP, Menis S, Ota T, Kalyuzhniy O, McGuire A, et al. Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors. *Science* 2013; **340**:711-716.
- [414]. Hessel AJ, Rakasz EG, Tehrani DM, Huber M, Weisgrau KL, Landucci G, et al. 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. *J Virol* 2010; **84**:1302-1313.
- [415]. Kramer VG, Siddappa NB, Ruprecht RM. Passive immunization as tool to identify protective HIV-1 Env epitopes. *Curr HIV Res* 2007; **5**:642-655.
- [416]. Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Rasmussen RA, Jiang S, Li PL, Baba TW, et al. Postnatal pre- and postexposure passive immunization strategies: protection of neonatal macaques against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J Med Primatol* 2002; **31**:109-119.

- [417]. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996; **2**:1240-1243.
- [418]. Van Herrewege Y, Vanham G, Michiels J, Fransen K, Kestens L, Andries K, et al. A series of diaryltriazines and diarylpyrimidines are highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors with possible applications as microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**:3684-3689.
- [419]. Strokappe N, Szynol A, Aasa-Chapman M, Gorlani A, Forsman Quigley A, Hulsik DL, et al. Llama Antibody Fragments Recognizing Various Epitopes of the CD4bs Neutralize a Broad Range of HIV-1 Subtypes A, B and C. *PLoS One* 2012; **7**:e33298.
- [420]. Stanfield RL, Dooley H, Verdino P, Flajnik MF, Wilson IA. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *J Mol Biol* 2007; **367**:358-372.
- [421]. Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF, Wilson IA. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science* 2004; **305**:1770-1773.

Annexes

Annexes

Durant mes travaux de thèse, j'ai rédigé deux revues qui faisaient l'état de l'art des dernières études sur la structure de la gp160 et sur l'immunogénicité des régions qui la composent. Mes travaux ont été publiés en 2011 sous forme d'un chapitre de livre qui traitait des avancées cliniques et scientifiques sur le VIH et en novembre 2012 (Annexe 1) sous forme d'une revue dans Journal of Virology (Annexe 2).

J'ai également participé aux travaux de Dr. R. DAWOOD portant sur la génération d'anticorps IgG monoclonaux neutralisants dirigés contre le complexe de fusion. Ces travaux ont été publiés dans AIDS Décembre 2012 (Annexe 3).

HIV-1 Glycoprotein Immunogenicity

Fahd Benjelloun, Christian Genin and Stephane Paul
 University of Saint-Etienne (IPRES LYON)
 Group of mucosal immunity and pathogens GIMAP EA3064
 France

1. Introduction

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is a C-type enveloped retrovirus (classification based on morphology of retroviruses electron microscopy) of the *Retroviridae* family. It's consisting in a genome of 2 positive stranded RNA molecules and a specific polymerase reverse transcriptase enzyme (RT). The viral RNA is reverse transcribed by RT into a double-stranded DNA molecule which is then integrated into the genome of infected cells (figure 1). The virus is wrapped by a bilayer membrane derived from the host cell. Homotrimers of the viral glycoprotein gp160 are inserted in the envelope (figure 1). Several cellular proteins are also incorporated into the viral membrane with relative abundance, including MHC class I and II molecules and intracellular adhesion molecule. Lentiviruses, to which HIV belongs, cause disease with a 'slow' evolution preceded by a period of clinical latency. Apart from humans, lentiviruses infect several other species of mammals such as

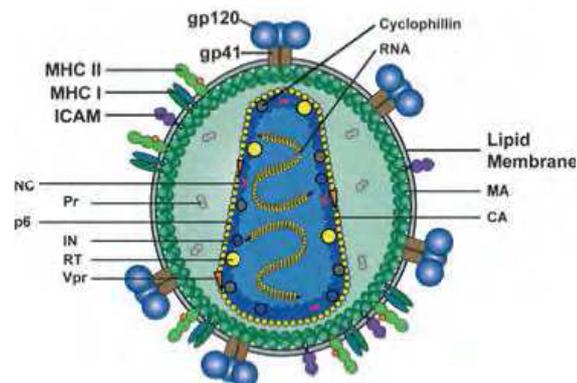


Fig. 1. Schematic representation of the HIV-1 particle. Two copies of the viral positive stranded RNA genome are packed in the capsid. Viral enzymes: reverse transcriptase (RT), integrase (IN), protease (Pr) and structural proteins; capsid (CA), nucleocapsid (NC), matrix (MA) and p6 are inside the particle together with the viral regulatory protein Vpr and the cellular protein cyclophilin (Phogat et al., 2007).

primates (Simian Immunodeficiency Virus, SIV), feline and ovine. Infection by HIV-1 causes a very rapid destruction of the majority of T cells memory CD4⁺/CCR5⁺ and especially those residing in the intestinal mucosa.

Although antiretroviral therapy for HIV infection prevents AIDS-related complications and prolongs life, it does not fully restore health. Long-term treated patients remain at higher than expected risk for a number of complications typically associated with aging, including cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, and other end-organ diseases. The potential effect of HIV on health is perhaps most clearly exhibited by a number of immunologic abnormalities that persist despite effective suppression of HIV replication. These changes are consistent with some of the changes to the adaptive immune system that are seen in the very old ("immunosenescence") and that are likely related in part to persistent inflammation. HIV-associated inflammation and immunosenescence have been implicated as causally related to the premature onset of other end-organ diseases.

This review summarizes the importance to generate immune responses against HIV-1 glycoprotein in further vaccinal approaches and detail the complexity of the envelope structure and the relative high HIV-1 glycoprotein immunogenicity.

2. Molecular basis of HIV envelope glycoprotein

2.1 HIV-1 envelope glycoprotein

The gp120 (SU) and gp41 (TM) envelope glycoproteins are encoded by the HIV gene *env*. This gene codes for an Env precursor polyprotein (p90) which undergoes post-transcriptional modifications as glycosylations resulting in the gp160 precursor. It is interesting to note that the HIV cleavage sequence is highly conserved (Veronese et al., 1985) and is included in one of the most conserved domains within gp120 (C5). Gp160 is produced as an inactive precursor in the rough endoplasmic reticulum and subjected to extensive N-glycosylation resulting in high mannose chains linked to Asn residues at either Asn-X-Ser or Asn-X-Thr glycosylation sites. The gp160 are sorted through the constitutive secretory pathway of the infected cells (Moulard and Decroly, 2000). Once transported to the cellular plasma membrane, trimeric gp120-gp41 complexes are incorporated into budding virus for the release of new infectious particles. Before its anchoring on the surface, gp160 is cleaved by a host protease named furin in two sub-units associated by non-covalent interactions (gp120 on the surface and the transmembrane gp 41) (Hallenberger et al., 1992). Envelope glycoproteins form trimeric spicules of gp120-gp41 complexes on the surface of the virus conferring viral tropism (Chan and Kim, 1998). Env is also involved in the interaction, recognition and the fusion of the viral and cellular membranes leading to the introduction of the viral genome into the cytoplasm of the target cells. The Env spikes are thought to be trimeric and structure-based models have been proposed (figures 2&3). Cryoelectronic microscopy tomography shows heterotrimeric complexes (Roux and Taylor, 2007; Briggs et al., 2009). However, despite intensive efforts, the arrangement and orientation of the loop-deleted gp120 core atomic structures within a native Env spike and their association with the gp41 subunits have remained largely speculative.

The entry of virus into the target cell involves the fusion of cell membranes and the viral envelope. Whereas, the recognition of the target cell by the gp120 is not sufficient to directly cause membrane fusion and mediate the injection of viral genome. The adsorption of HIV-1 on cell surface is mediated by interactions between envelope glycoproteins and two types of surface molecules: attachment factors (or adhesion receptors) and coreceptors (figure2).

Coreceptors are actively involved in the penetration of the virus and are selective for the entry of the virion into the host cells depending on their tropism.

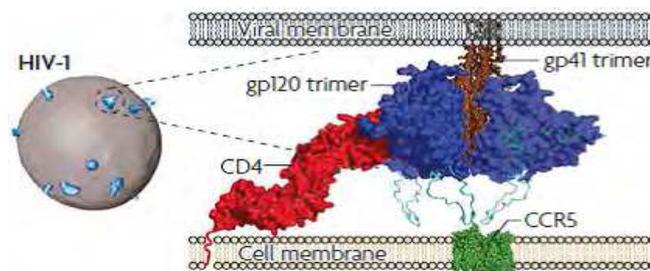


Fig. 2. Schematic representation of the interaction between envelope glycoprotein and viral receptors. On the left, a surface rendered cryo-electron microscopy tomographic image of HIV-1. Viral spikes are blue and the viral surface is grey. On the right is shown a structure-based model of the envelope glycoproteins of HIV. Trimeric HIV-1 gp120 proteins shown in cyan bind to the primary receptor, CD4. Following conformational changes, the gp120-CD4 complex binds the chemotaxis receptor adapted from (Karlsson Hedestam et al., 2008).

2.2 Gp120 envelope glycoprotein

Gp 120 glycoprotein represents the external part of the envelope glycoprotein of HIV with a molecular weight of 120 kDa. It contains 480aa with 9 disulfide bridges and 20 to 24 N-glycosylation sites. Gp120 is involved in the earlier steps of the infection of target cells. HIV-1-receptor binding is mediated by external Env gp120, which binds the CD4 primary on target cells. Then, a series of Env conformational changes occur that result in exposure of a transient binding site allowing the virus to interact with its co-receptor, usually the chemokine receptor CCR5 or CXCR4, to initiate another cycle of infection (figure 3A, B). HIV-1 gp120 consists of five conserved (C1-C5) and five extremely variable (V1-V5) domains. The conserved domains contribute to the core of gp120, while the variable domains (and numerous N-linked glycosylation sites) are located near the surface of the molecule. The gp120 is extensively glycosylated with N-linked glycan host derived carbohydrates. The role of these modification is to mask them and their micro-heterogeneities form a perfect immunological shield that allow a decrease of the immune response against viral particles (Pancera et al., 2010) The presence of glycosylation sites in the V3 region seems to affect the viral tropism. Removal of the glycosylation site at position 301 allows the chimeric virus to evolve to X4 phenotype (Pollakis et al., 2001). The removal of three amino acids on different glycosylation sites of gp120 from the laboratory strain X4R5 HIV89.6 tropism results in the loss of tropism for CCR5 (Yang et al., 2010). This phenomenon could be due to the unmasking of neighboring basic amino acids or the loss of negative charges located on the glycoprotein. Moreover, the number of glycosylations present on gp120 influences its secondary structure, which could alter the interactions between the V3 region and neighboring regions (figure 3F). The ability of some strains to be infectious and replicate even in the absence of V3 loop has been described (Cormier & Dragic, 2002)(Lin et al., 2007). The V3 region (35 amino acids) plays a significant role in the recognition and interaction with the cellular receptors of the target cell. This region also

contains at its extremity a highly conserved sequence of amino acids (GPGRAF). This pattern is surrounded by variable amino acids which alter the viral tropism through interaction of gp120 with the cellular chemokine CCR5 and CXCR4. The V1-V5 regions form exposed loops anchored at their bases by disulfide bonds (Teixeira et al., 2011). Crystal structure of gp120 shows that this protein is folded as a connection of four β elements called "bridging sheet" with an inner and an outer domain (Kwong et al., 1998). The internal domain is a near point of contact with gp41 and the N and C-Term of gp120. In the native conformation, trimers are more stable due to the interaction with gp41 and V1-V2 loops. Oligomeric gp120 protein can adopt a conformation called 'closed' as in primary isolates resulting in masking the receptor binding site of CD4 in V1 and V2 regions while gp120 of TCLA viruses preferentially adopt an 'open' shape thereby reducing its affinity for this receptor. Finally the interaction with CD4 gives rise to an open structure enabling the link of viral and cellular membrane and an exposition of the V3 loop (Roux & Taylor, 2007).

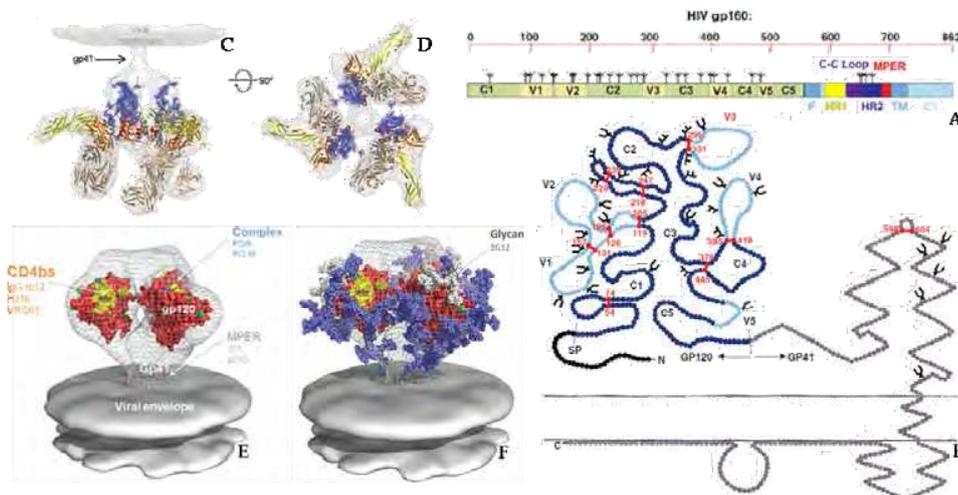


Fig. 3. Schematic representations of HIV-1 envelope glycoprotein A) Glycosylations sites present on gp160 glycoprotein B) Structure of the gp120-gp41 glycoprotein envelope of HIV (Pancera, 2005). C, D, E, F are obtained by cryo-electron tomography C) Structure of an HIV-1 gp120 core with intact gp41-interactive region D) 90° rotation of C placement of the gp120-CD4 complex in the electron density map (light gray), residues involved in gp41 interactions are colored with blue (Pancera et al., 2010) E) Schematic representation of HIV-1 native viral spike. The glycoprotein is shown as a transparent framework and represents three gp120 molecules non-covalently linked to three gp41. Epitopes of broadly neutralizing monoclonal antibodies on gp120 (red) or gp41 are labelled with arrows. The IgG1b12-binding surface is labelled yellow, and the bases of the variable regions (missing in this structure) are labelled blue, green, and pink. (F) The same model with the gp120 glycans shown in blue reveals the extensive glycosylation present as an antibody evasion mechanism on Env, and glycans implicated in BNMAb 2G12 binding are highlighted in white and labelled with an arrow. HIV-1, human immunodeficiency virus type-1; MPER membrane-proximal external region patterns obtained from the works of (Sattentau & McMichael, 2010).

CD4 receptor binding site

The main receptor of HIV is the CD4 membrane glycoprotein. Binding to CD4 initiates the process of infection. Different models forecast the exact configuration of some regions of the gp120 protein whereas they all show clearly the important structural differences in the organization of the trimer between the free and the associated form with CD4. The CD4 molecule binds with high affinity to gp120 protein (Klatzmann et al., 1984). The CD4 binding site is composed of relatively conserved regions located between the two domains of gp120, and the β inter-domains sheet. The contact areas are discontinuous in the native three-dimensional structure of protein. The CD4 binding domain is located in the D1 domain of the CDR2 loop (Complementarity Determining Region 2), on the opposite side of HLA type II binding domain (Fleury et al., 1991). In this area, two residues, Phe43 and Arg59, are particularly important in establishing interactions with gp120 residues of the CD4 binding site (including Glu³⁷⁰, Trp⁴²⁷ and Asp³⁶⁸) (Tachibana et al., 2000). The affinity of CD4 to the envelope glycoprotein of HIV is highly variable depending on its quaternary structure (monomeric or oligomeric) and tropism. In addition, gp120 is conformationally flexible, the site of initial CD4 attachment is conformationally inert (Zanetti et al., 2006; Zhu et al., 2006; Roux & Taylor, 2007).

Co-receptors of HIV

The two main HIV co-receptors are the chemokine receptors CXCR4 and CCR5 (figure7). CXCR4 and CCR5 are ubiquitously expressed in immune cells. CXCR4 and CCR5 belong to the superfamily of receptors linked to G proteins and are characterized by a structure comprising an extracellular N-Term segment, seven transmembrane domains in helices, three extracellular loops or ECL, three intracytoplasmic loops or ICL (intracellular loop) and an intracytoplasmic C-Term segment. The N-Term segment and extracellular loops are responsible for receptor affinity for its ligand (Allen et al., 2007).

The natural ligand for CXCR4 is the SDF-1 molecule (Stromal Derived Factor-1), a chemokine α of CXC type (presence of two cysteines separated by one amino acid). As a ligand, it induces internalization of CXCR4 by a process of vesicle clathrin-dependent endocytosis, resulting to its degradation. CCR5 is the receptor of three chemokine β of CC-type (with two adjacent cysteines), all produced by CD8 T cells: RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and secreted), MIP-1 α and β (Macrophage Inflammatory Protein-1). RANTES induces CCR5 internalization and is recycled to the cell membrane without being degraded. According to the coreceptor involved in HIV entry into the target cell, the virus is classified depending on its tropism. Thus, viruses use the CCR5 receptor (expressed by monocytes, macrophages, activated T cells or memories and DC) are called 'CCR5-tropic' (or virus type 'R5') and those using the CXCR4 coreceptor (expressed by T cells, monocytes and DCs) are appointed, CXCR4-tropic '(or virus 'X4'). CXCR4 is the coreceptor identified as responsible for the entry of HIV in the lymphoid lineages adapted X4 viruses are also called 'T-tropic' or 'lymphocytotropic', whereas R5 viruses are called 'M-tropic' or 'monocytotropic'. Some isolates are capable of using both CXCR4 and CCR5 coreceptor and are referred as 'X4R5' or 'dual-tropic'. This classification has replaced an old classification based on the ability of the virus or not to induce syncytium formation (a reaction resulting in the cytopathic membrane fusion of several adjacent cells leading to the formation of a 'giant cell' multinucleate) at a T cell line (MT-2). It is now accepted that viruses using the CXCR4 coreceptor to enter target cells induce the formation of syncytia (SI virus like 'Syncytium Inducing virus') in contrast to viruses using exclusively CCR5 (NSI viruses for 'No Syncytium Inducing virus').

2.3 Alternative receptors

However, cells which not express the CD4 molecule on their surface can also be infected, at least *in vitro*. The CD4 is not the only molecule favoring infection by HIV-1.

2.3.1 Interaction with Galactosyl-ceramide (α -GalCer)

Surface molecules such as the α -GalCer glycolipid or lactosylceramide sulfate, present on different tissues (brain, intestine, epithelium and cervix) are capable of binding to gp160 protein V3 loop. These molecules can be considered as alternative receptors for HIV. The α -GalCer is a glycosphingolipid (GSL) most commonly involved in the interactions between cells lacking CD4 and HIV. It binds to the V3 region of gp120 (Harouse et al., 1995). These sequences form a conformational site exposed on the gp120 surface which interact with the galactose residue of GalCer. The affinity of gp120 to GalCer was higher than for other GSL (Long et al., 1994). Saturating the V3 area of gp120 with GalCer analogs can prevent the infection of CD4⁺ T cells and CD4⁻ by HIV (Fantini et al., 1997). GalCer is also capable of binding to gp41 domain located in a 35 amino acids region containing the ELDKWA epitope (Alfsen and Bomsel, 2002). This interaction takes place only after fixation on gp120 and GalCer stabilization. The α -GalCer/gp120 or gp41 interaction is also essential for viral particles transmission during endocytosis or transcytosis. The GSL are constituents of the lipid bilayer of the cell membrane and are associated with glycosphingolipides (LPG) and cholesterol. This association form within the membrane microdomains distinct called "lipid rafts" (or 'rafts') (Simons and Ikonen, 1997). These lipid rafts traffic areas are preferred across the cell membrane for various pathogens or their toxins that use protein or lipid components of these micro-domains like receptors (Van der Goot & Harder, 2001). Lipid rafts are involved in the infectious cycle of HIV, particularly for the entry into target cells (Campbell et al., 2001). In the case of CD4-dependent infection and after fixation of the gp120 on CD4, an interaction between the central portion of the V3 region and the GSL would be essential to the establishment of the association between gp120 and coreceptors (Nehete et al., 2002). GSL present in lipid rafts can stabilize the attachment of the virus to the cell surface and to ensure migration of gp120-CD4 complex to a co-receptor. Rafts can move within the membrane and facilitate conformational change of gp120 leading to the insertion of the fusion peptide.

2.3.2 Interaction with C-type lectins

C-type lectins (CLR, C-type Lectin Receptor) are proteins that attach, with a calcium-dependent way, the carbohydrate residues through their CRD domain (Carbohydrate Recognition Domain). They are particularly expressed on dendritic cells where they play a key role in capturing pathogens by binding carbohydrates present on micro-organisms (Weis et al., 1998). There are two categories of CLR: CLR's type I which exposed their N-Term part outside the cell and the type II CLR with intracellular N-Term domain. The majority of CLR binds D-mannose, D-glucose or D-galactose and their derivatives. Four CLR type lectins have the ability to bind to gp120: MMR, MBL, DC-SIGN and Langerin.

Lectin MMR (Macrophage Mannose Receptor, or CD206) is highly expressed by dendritic cells generated *in vitro* from monocytes but not expressed by those of blood. Macrophages are capable of transferring HIV to cells expressing CD4 using this receptor (Nguyen and Hildreth, 2003).

MBL (Mannose Binding Lectin) is a CLR type I present in serum as a soluble form where it can bind to pathogens and initiate their attack by the complement system. It is capable of

binding to HIV through highly mannosylated oligosaccharides residues contains in the gp120 (Saifuddin et al., 2000).

The CLR type II DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin, or CD209), is expressed as tetramers in lipid rafts of immature dendritic cells (Cambi et al., 2004). Its natural ligand is ICAM-3 (intercellular adhesion molecule-3 or CD50) also present on T cells which allow its interaction with dendritic cells (Geijtenbeek et al., 2000a; Geijtenbeek et al., 2000b). Like MBL, DC-SIGN binds mannose residues embedded into more internal patterns and more complex than MMR. DC-SIGN binds to Gp120 from many strains of HIV and SIV which harbor many oligosaccharides rich in mannose residues (Geijtenbeek et al., 2000b). Finally, Langerin (or CD207) is a CLR type receptor specifically expressed by Langerhans cells. Langerin is responsible for the formation of Birbeck granules (Valladeau et al., 2000) and contains a specific region which interacts with gp120 (Turville et al., 2002).

2.3.3 Interaction with the $\alpha 4\beta 7$ integrin

It was recently demonstrated that gp120 activated form is also able to bind $\alpha 4\beta 7$ integrin expressed on gut-homing T and B lymphocytes and CD4⁺ NK cells (figure4). A tri-peptide loop (Leu-Asp-Val) at the V2 loop, mimicking the binding motif of the natural ligands of $\alpha 4\beta 7$, is involved in this interaction. This binding enables the formation of viral synapse through the activation of LFA-1 (Arthos et al., 2008). By this way, HIV-1 induces a massive depletion of gut CD4⁺ T cells which participate to the immune dysfunction in HIV patients.

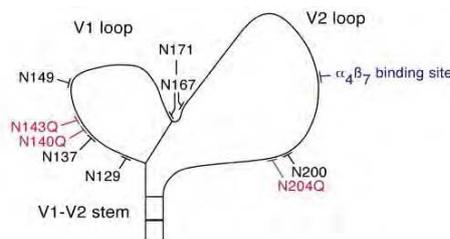


Fig. 4. Positions of all potential N-Glycosylation and $\alpha 4\beta 7$ binding sites located in the V1/V2 loop gp120 (Nawaz et al., 2011).

2.4 Gp41 envelope glycoprotein

The binding of gp 120 to CD4 and coreceptors permits its conformational changes and triggers the establishment of the fusion complex compounds by trimers of gp41 (figure6). (Salzwedel et al., 1999, Munoz-Barroso et al., 1999, Dwyer et al., 2003). Gp41 is the transmembrane domain of the entire envelope glycoprotein which anchors the viral spikes in the bilayer lipid membrane of viral particles and plays an important role in membrane fusion and cell entry. Gp41 is composed by 345 amino acids (512 to 856 of HIV-1 HXB2 strain) with a molecular mass of about 41KDa. Gp41 presents an extracellular domain or ectodomain, a transmembrane domain or membrane spanning domain, and an intracytoplasmic domain (figure5). Gp41 sequences are clearly more conserved than gp120 and also contain only four N-glycosylation sites on its ectodomain. These glycosylation sites are highly conserved and appeared to contribute to optimal viral replication efficiency (Johnson et al., 2001).

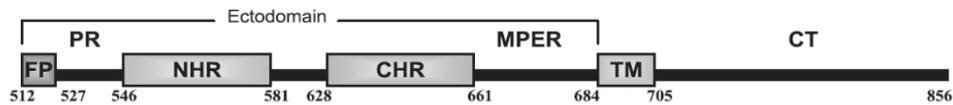


Fig. 5. Schematic representation of gp41 domains. Gp41 is divided in 3 regions. The ectodomain contains the fusion peptide (FP), a polar region (PR), N and C-terminal heptad repeat regions separated by an immunodominant region (NHR & CHR), a rich tryptophane highly conserved region (MPER), a transmembrane region (TM) and an intracytoplasmic tail (CT) (Montero et al., 2008).

Gp41 contains different domains involved in the fusion process of viral and host cell membrane. The N-Term hydrophobic region consist in the fusion peptide (512-527), a polar region (525-543) called the Fusion Peptide Proximal Region (FPPR) or Polar Region (PR), the N-Term heptad repeat (NHR or HR1) (546- 581) and C-Term heptad repeat (CHR or HR2). These regions are folded as α -helix and linked by a loop called immunodominant loop (598-604) containing a disulfide bridge. A highly conserved Tryptophan Rich Membrane Proximal Ectodomain/External Region (MPER) (660-683) is also present (Chan et al., 1997). Finally, the membrane spanning domain or transmembrane (MSD/TM) and the intracytoplasmic tail or C-tail are two other hydrophobic regions present at the C-Term portion of gp41 (figure5). A complete description of the whole molecule gp41 is not clearly defined. A crystallized intact trimer would be structurally definitive, but it's seems that large regions appear to be in constant motion as part of the conformational masking defence of potential epitopes from Abs. It is widely assumed that the failure of Env-based vaccine candidates to date relates, in part, to the difficulty in generating soluble versions of Env proteins that faithfully mimic key structural features of native *in situ* Env.

2.4.1 Fusion peptide (FP)

The FP corresponds to the first N-Term domain of the gp41 ectodomain (figure5). FP is highly conserved among HIV-1 clades and other viruses. For example, GFLG is a pattern found among fusion peptides of different retroviruses such as HIV-1, HIV-2, SIV and HBV (Durell et al., 1997). A mutation in the GFLG alters the fusogenicity of the FP (Pritsker et al., 1999). Other studies of HIV with truncated or mutated FP showed that it's crucial to the fusion process and viral entry into host cells (Qiang et al., 2009).

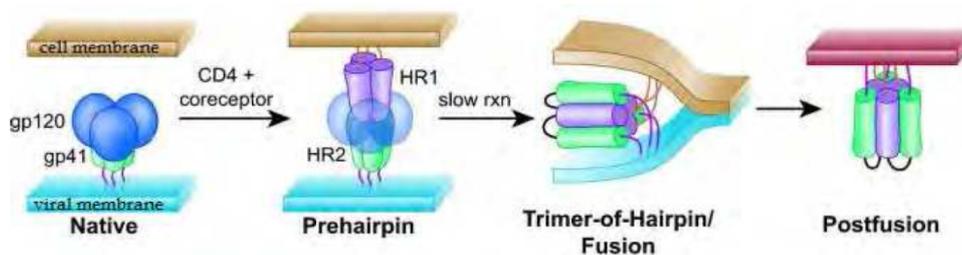


Fig. 6. Model of HIV entry pathway and gp41 conformational intermediates. Gp41 HR1 and HR2 regions are depicted in magenta and green, respectively (Miller et al., 2005).

FP is mostly hydrophobic (Del Angel et al., 2002). The substitution of glycine residues results in a fusogenicity decrease (Vanlandschoot et al., 1998). It has been suggested that the succession of FP glycines is involved in the oligomerization of fusion peptides, in the balance of amphipathicity necessary for membrane fusion and/or orientation of fusion peptides in the membrane (Delahunty et al., 1996). Recent studies showed that FP can also change its conformation according to the biochemical environment ((Buzon et al., 2005; Gordon et al., 2008). Solid-state nuclear magnetic resonance (MNR) spectroscopy (Zheng et al., 2006) confirmed that the FP oscillates from an α -helical state in low concentration of cholesterol to the β -strand form what reveals a high playing a crucial role during the viral fusion process. There are also controversies over the functional structure and the size of the FP it could have a different length and by the way a different sequence as 16 aa (Kamath and Wong, 2002), 23 aa (Delahunty et al., 1996; Gordon et al., 2002) or 33 aa (Pritsker et al., 1999). To date the native structure in prefusogenic and fusogenic state remains unravelled.

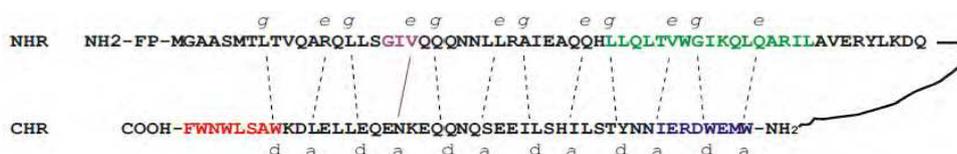


Fig. 7. Interaction between critical sequences in NHR and CHR regions of gp41 fusion intermediate. Dashed lines between the NHR and CHR domains indicate the interaction between the residues located at the e, g and a, d positions in the helical spiral of NHR and CHR domains, respectively. The critical sequences in NHR and CHR include: GIV (residues 547–549, *red*) is a determinant of resistance to T-20 in NHR region, LLQLTVWGIKQLQARIL (residues 565–581, *green*) is the cavity-forming sequence in NHR region, WMEWDREI (residues 628–635, *orange*) is the cavity binding sequence in CHR region; and WASLWNWF (residues 666–673, *pink*) is a partial tryptophan-rich sequence (Pan et al., 2010).

2.4.2 N-heptad repeat (NHR) / C-heptad repeat (CHR) regions

Adjacent to the FP is the first of two HR's (N and C-HR, respectively) that play critical roles in the fusion activity of gp41 (figures 5, 6). HR motifs contain a characteristic repeating pattern of seven residues (abcdefg). Amino acid sequence of these segments is composed of seven AA which occupy seven positions on the fusogenic structure forming a pattern. This pattern repeats 7 times hence the name seven-repeat (heptad repeat). In the CHR, AA in position "a" and "d" are generally apolar or hydrophobic and are crucial for stabilizing trimers (figures 7, 8). The "e" and "g" residues in NHR frequently interact with residues in the "a" and "d" positions. Characteristic packing of the hydrophobic side chains as the HR in a helical configuration stabilizes the coiled-coil structures N-HR (aa 541–581). Two binding sites have been characterized which bind the CHR region (aa 610–683) through the residues "g" and "e" or the endogenous homotrimeric NHR region through the residues "a" and "d" (Bewley et al., 2002).

A five-amino acid hydrophilic loop containing two cysteine residues with an intramolecular disulfide bridge links the two HR regions together. These cysteines are highly conserved among retroviruses. It has been proposed that this loop creates a 'knob-like' protrusion in the TM subunit that permits packing in a cavity 'socket' in the surface subunit (figure 6). This region is disordered in high-resolution studies of the gp41 ectodomain and has been

reported to lead to aggregation of the protein (Caffrey et al., 2000). Structures of pre-fusion forms of gp41 are undetermined. Nevertheless the crystal structure of gp41 and X-ray and NMR structures determines its 6Helix Bundle and final states this studies revealed that three NHR are folded into a central triple-stranded coiled coil of α -helices, and three CHR are packed, anti-parallel, as α -helix into the three channels of the coiled-coil (figures 6, 7, 8A) (Chan et al., 1997). The inner-helical NHR trimer in the 6HB structures has been used to model the receptor-activated state of gp41 and to design several mimetics of the NHR coiled-coil that can potently inhibit fusion like the T20 or N36 peptides. This 6HB is thermally stable and can confidently be considered a final structure. The formation of 6HBs was originally accepted as being the process that brings the viral and the cellular membranes together and allows the aggregation of several activated Env complexes to form a pore, leading to the entry of the nucleocapsid into the cell (Markosyan et al., 2009).

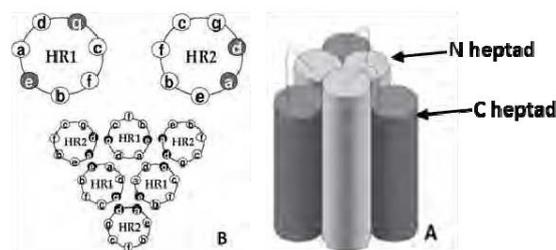


Fig. 8. Schematic representations of the six-helix bundle (6HB) in gp41 at the fusogenic state. A) Description of the six helix bundle: describes the N-(bright) and C-(dusky) heptad repeats that fold in an anti-parallel shape (hairpin). Three monomers of NHR form a α -helix trimer in the central triple-stranded coiled coil and the C-HR region comes to bind the grooves of this structure to form the final state of 6HB. The link between the two heptad repeat regions is involved in the aggregation of this complex. (Weiss, 2003) B) Overview of depiction of a 6 helix bundle. Three NHR from each gp41 monomer form grooves and to complete the bundle three HR2 dock in them (Markosyan et al., 2009).

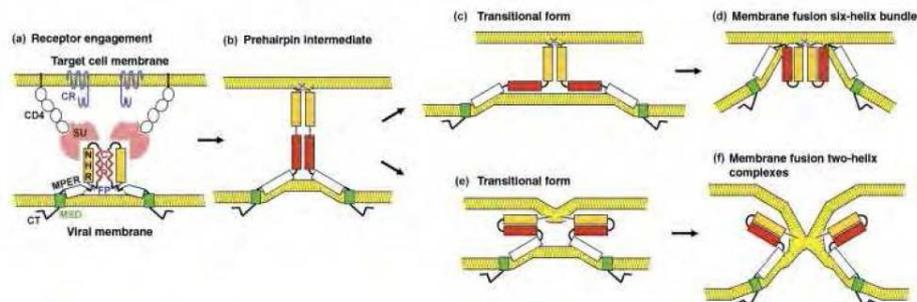


Fig. 9. Schematic speculative representation of topological questions related to single-spike-mediated fusion mechanisms. a,b) gp120 interacts with CD4 then with a co-receptor CR. The binding of the fusion peptide segment allows a changing of conformation and the HR regions form pre-hairpin shapes. c, d) Model where conformational changes undergo easily but require membrane breaks to form the 6HB. E, f), Second model where the membranes remain intact during the folding of gp41. CHR and NHR helix bind together and form the fusion pore. NHR, gold; CHR, red (Roux & Taylor, 2007).

2.4.3 The Membrane Proximal Ectodomain/external Region (MPER)

The MPER segment or Membrane-Proximal External Region is bordered by HR2 region and TM segment of gp41 (figures 5, 9). This region is rich in tryptophan residues and interacts with cholesterol in the lipid bilayer cell membrane playing an important role in the viral fusion process and infectivity of HIV-1 (Salzwedel et al., 1999). MPER seems to be involved in the early steps of viral fusion and syncytium formation (Munoz-Barroso et al., 1999). Mutations in MPER induce a decrease of the virus ability to cause syncytium formation in infected cells due to the inability to form the fusion complex (Zwick et al., 2001; Veiga and Castanho, 2007). MPER is highly conserved and represents a major target for therapeutic approaches. MPER sequence (⁶⁸⁸ELDKWASLWNWFNITNWLWYIK⁶⁹³) is the same in most HIV-1 strains and includes epitopes of 3 well described human broadly neutralizing monoclonal Abs as (ELDKWA) for the 2F5 and WF(N/D)IT for 4E10 and Z13 (figure 12) (Ofek et al., 2004; Zwick and Burton, 2007). MPER has also been described as α -helix or as an extended β -turn. Recent studies have revealed that MPER adopts a helical form that is kinked and somewhat L-shaped and the segment that contains the epitope of 4E10 is embedded within the bilayer lipid membrane (Sun et al., 2008; Franquelim et al., 2011). The structure of the MPER in the context of lipids is well known, but the question of its native structure(s) on the cell surface in the context of gp41 remains open.

2.4.4 Transmembrane (TM) or Membrane spanning domain (MSD)

The TM region or MSD contains 25aa (aa681-705) is surrounded at its N-Term side by MPER and by the cytoplasmic domain at its C-Term tail (figures 5, 9). This region is encrusted in the viral bilayer lipid membrane and anchors the gp41 into the membrane. This highly conserved region is composed mostly of neutral and hydrophobic AA (figure 10). Two models have been proposed to explain the conformation assumed by MSD: a stable sloping α -helical conformation and a metastable kinked curved conformation and the MSD seem to switch from one to another while conformational changes of the gp41 (Gangupomu and Abrams, 2010).



Fig. 10. AA sequence of HIV-1 membrane spanning domains: The consensus sequence of the HIV-1 MSD was generated by the alignment of the Env MSD sequences of all M and N groups HIV-1 isolates from the Los Alamos HIV database. The graphic shows the percentage of conserved residues among isolates from (Shang et al., 2008).

The MSD contains two common features of lentiviral MSD, a basic charged residue Arg⁶⁹⁴ buried in bilayer lipid membrane (Shang et al., 2008) and a very conserved motif ⁶⁸⁸GXXXG⁶⁹⁴. The loss of this feature doesn't affect the formation of glycoprotein Env trimers during the transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. However, it alters the membrane fusion and viral infectivity such as the loss of Lys⁶⁸¹, Arg⁶⁹⁴ or Arg⁷⁰⁵ (Shang et

al., 2008). The MSD or TM plays a very important role in viral fusion (figure9) (Miyachi et al., 2010). Truncation studies on HIV-1 Env revealed that only 17 amino acid residues (Lys⁶⁸¹-Ala⁶⁹⁷) are needed for a stable anchoring of the gp41 in the membrane and mediating cell to cell fusion (Yue et al., 2009). Small deletions (three amino acid residues) in the region between Arg⁶⁹⁴ and Arg⁷⁰⁵ showed normal cell to cell fusion, while larger deletions were more deleterious, suggesting that, the length of this region is more important than its AA sequence (Owens et al., 1994). Substitution of all leucine residues or two other highly conserved residues, Phe⁶⁸³ with Val⁶⁸⁷ AA residues in the helical core of MSD is critical for the fusogenicity of Env complexes and infectivity (Shang et al., 2008).

2.4.5 The C-Term tail / intra cytoplasmic tail (CT/ICS)

Lentiviruses, including HIV-1, have TM envelope (Env) glycoproteins with cytoplasmic tails (CT) that are quite long compared with those of other retroviruses. The gp41 CT is remarkably long and follows the MSD. CT is a hydrophobic region of 150 AA inserted into the plasma membrane (figure9A, 11) (Viard et al., 2008). The CT contains three regions called lentiviral lytic peptide and form amphipathic helices. The LLP1 and LLP2 regions have high hydrophobic properties. It has been admitted that the CT is entirely contained inside the cell or virion (Gallaher, 1987). Whereas it has been revealed that there are Abs directed to an epitope in the CT and some of them present neutralization properties on HIV virions (Cleveland et al., 2003; McInerney et al., 1999; McLain et al., 2001; Reading et al., 2003). Then, since antibodies do not traverse the membrane and infectious virus are by definition intact, this suggests that part of the tail is exposed on the virion surface allowing antibody binding and neutralization, thus contrasting with the traditional intracytoplasmic location of the entire C-Term sequence of gp41 (Hollier & Dimmock, 2005). Studies have attempted to address this divergence between the old model of an exclusively intracytoplasmic tail and an alternative model with external segments of the CT, as the Kennedy peptide (aa731-752) (Kennedy et al., 1986) containing three patterns a conserved one ⁷⁴¹EEEEGGE⁷⁴⁶ and two others ⁷⁴⁷QDRDRS⁷⁵² or ⁷³¹PRGPDRPGRI⁷⁴⁰. At the early steps of the viral entry, CT is implicated in the regulating of the kinetics of fusion and in the ability of Env to promote syncytia (Edwards et al., 2002; Wyss et al., 2005). Mutational studies have revealed that long CT interacts with domains of HIV matrix like the p55 Gag protein during the budding and this interaction is required for the envelope incorporation into the virion (Dubay et al., 1992; Yu et al., 1993).

3. Envelope glycoprotein immunogenicity

HIV -1 patients generate strong Ab responses to the viral envelope glycoprotein. However, these antibodies are generally strain-specific or non-neutralizing what disable the immune system to install a protective or a preventive immune response (Kwong et al., 2002; Wei et al., 2003). Most of the monoclonal antibodies raised against the env glycoprotein seems to be shaped by 1F7 (IgM) idiotype dominance (Zhou et al., 2010). Evidence suggests that anti-HIV broadly neutralizing Abs requires high levels of somatic hypermutation and polyreactivity. However it is unclear if Abs without 1F7 idiotype also requires these characteristics to neutralize a broad spectrum of viral variants. It is also unknown whether BnAbs not expressing the 1F7 idiotype are any easier, or even possible, to induce by vaccination than idiotypic BnAbs, if the 1F7 idotype is suppressed (Parsons, M.S. et al., 2011). Genetic sequence variability created by its error prone reverse transcriptase and by host immune pressure lead

to the evolution of the HIV-1 into multiple subtypes or clades with circulating recombinant forms. A fundamental barrier to HIV-1 vaccine development lies with the unique properties of the virus to predominantly enter through mucosal surfaces, to target preferentially human CD4⁺ T cells, and to establish quickly a persistent reservoir of latently infected cells. Properties of transmitted (founder) viruses from mucosal transmission indicate that in 70–80% of cases, a single virus or virus-infected cell establishes productive clinical infection (Fischer et al., 2010). Such viruses typically exhibit C-C chemokine receptor type 5 (CCR5)-dependence. Mask functional envelope trimers needed to trigger efficient antibody response, and undergo rapid mutation as productive infection ensues (Goonetilleke et al., 2009; Keele et al., 2008). These viral properties narrow innate and adaptive immune pathways that can efficiently defend against HIV-1 entry and productive infection. Because of this global diversity (up to 35% in envelope gp120), it may be impossible to design a single vaccine candidate that can induce potent effector immunity to multiple key antigenic determinants among worldwide circulating infecting HIV-1 strains. Although innate immune mechanisms contribute to HIV-1 control (Alter et al., 2007; Alter & Moody, 2010), it remains unclear whether recapitulating these responses with a vaccine will enhance protection against HIV-1 acquisition.

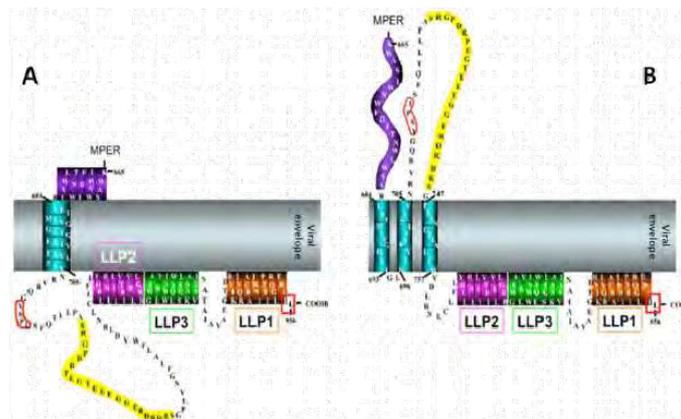


Fig. 11. Schematic models of the HIV-1 CT. A) A total intracytoplasmic localization of the CT with one membrane-spanning α -helix sequence (Traditional model). B) Alternative model with 3 MSD β -sheets and an extracellular segment that bears the Kennedy peptide Adapted from (Steckbeck et al., 2010).

3.1 Gp120 immunogenicity

During HIV-1 infection, gp120-specific Abs are generated and some of them are directed to conserved sites on Env crucial to host receptor recognition or viral fusion (table 2) Conventional insight suggests that constant rather than variable regions of Env should be targeted by the immune system to elicit broad responses against diverse HIV strains. However, these regions were classified on single criteria as the sequence and for only a few virus strains (Zolla-Pazner and Cardozo, 2010). Whereas immunological and 3-D structural studies of Env have shown that these regions were flexible and variable to interact with other surface molecules thus explaining how Abs specific for some variable regions have neutralizing activity against diverse viruses. Although, gp120-specific Abs typically

recognize type-specific neutralizing epitopes located on variable loops (Davis et al., 2009) or recognize dominant non-neutralizing conserved epitopes in gp120 (Palker et al., 1987) or gp41 (Gnann et al., 1987). Inducing neutralizing antibodies that target these epitopes using rationally designed immunogens has, so far, been unsuccessful (Selvarajah et al., 2005; Selvarajah et al., 2008; Wu et al., 2010).

This provides a rational basis for understanding the immunological cross-reactivity of many monoclonal Abs targeting the second (V2) and third (V3) variable loops of gp120, and the quaternary neutralization epitopes (QNEs) formed by V2 and V3. The glycan-rich outer face of gp120 is also the target of 2G12 broadly neutralizing mAb (Calarese et al., 2003; Huskens et al., 2007; Scanlan et al., 2002; Trkola et al., 1995). The V3 and the “bridging sheet” contain the binding site for co-receptor (CCR5 or CXCR4), but Abs against these targets are typically weakly neutralizing due to limited epitope exposure on native Env, and steric and kinetic restrictions post-CD4 engagement (Binley et al., 2004; Hartley et al., 2005; Reeves et al., 2005)

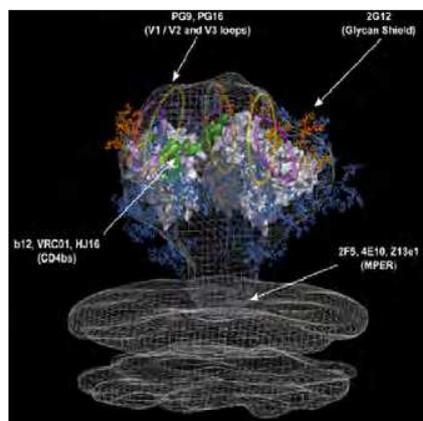


Fig. 12. Epitope modeling of HIV-1 trimer-specific neutralizing antibodies. The above model is adapted from a recent cryoelectron tomographic structure of the HIV-1 trimer (Liu et al., 2008; Schief et al., 2009). The crystal structure of the b12-bound monomeric gp120 core has been fitted into the density map (Zhou et al., 2007). The V1/V2 and V3 loops, which are not resolved in the structure, are represented as yellow and magenta ovals, respectively. The red structure located above the trimer is representative of a human IgG1 molecule. The approximate locations of the epitopes targeted by the existing NAbs are indicated with arrows. Carbohydrate chains are shown in blue, and the oligomannose cluster targeted by mAb 2G12 is shown in orange (Walker and Burton, 2010)

3.1.1 Receptor-binding sites

Binding of gp120 to CD4 results in gp120 conformational changes that expose the binding site for a secondary co-receptor, which is either of the chemokine receptors CCR5 or CXCR4 (Sterjovski et al., 2011). Crystallographic and biochemical studies of gp120 have provided valuable insights into mechanisms involved in CD4-binding and CD4-induced conformational changes that result in formation and exposure of the co-receptor binding site (Huang et al., 2005; Myszka et al., 2000). The unbound gp120 core consists of a highly conserved inner domain, which faces the trimer axis, and a heavily glycosylated, outer domain, which is mostly

exposed on the surface of the trimer (Kwong et al., 1998; Teixeira et al., 2011; Zolla-Pazner and Cardozo, 2010). CD4 binding site represents the encounter of three separate regions *via* their surface-exposed residues. These regions are distributed over 6 segments of gp120. These regions include the α -helices of the inner domain, the CD4-binding loop of outer domain, and the β 20– β 21 ribbon, that incorporate the gp120 bridging sheet, which is a structural element of gp120 formed after CD4 binding that is involved in co-receptor binding. Otherwise, thermodynamic and structural analysis of the interaction between gp120–CD4 showed evidence of a structured CD4-binding pocket on the unloaded gp120, and that CD4 binding site elements that influence gp120–CD4 affinity are formed from conformational alterations that occur after gp120 has encountered CD4 (Kwong et al., 1998; Myszka et al., 2000). All these structures occur in the very early steps of the recognition (tropism) and anchorage process and provoke broad immune response. However, Abs remains interesting due to their large capacity to neutralize HIV-1 (table 1). The antibody IgG1b12 recognizes an epitope that overlaps the binding site of gp120 to the CD4 receptor. Several antibodies specific of the CD4 binding site have been described by several teams as the 15th, F105, F91, 1125H, 21H, 654-30D and Fab b6. All these antibodies show responsiveness to monomeric gp120 from different isolates of HIV-1 while this response disappears with trimeric gp120 which is present on the viral envelope spikes. Only the b12 antibody binds these two forms, and neutralizes many strains of HIV-1 (Zwick et al., 2003). Recently, the VRC01 Ab has been identified by screening of sera from infected individuals. It could be detected with high proportion and titers in patients. VRC01 Ab has been mapped to the CD4 binding site of gp120 (Wu et al., 2010; Zhou et al., 2010). In these studies it was observed that among 190 circulating HIV-1 isolates tested for sensitivity to VRC01, 173 were neutralized and only 17 were resistant. A structural analysis of these 17 resistant isolates by threading their sequences onto the gp120 structure showed important variations in the V5 region. However, the low VRC01 resistance frequency suggests that VRC01 use a recognition mechanism that allows binding despite V5 variation. Study of VRC01 interaction with V5 shows that VRC01 recognition of V5 is different than CD4. The V5 loop fits into the gap between heavy and light chains. Interaction with the more conserved residues at the loop base is sufficient for the VRC01 activity independently of variation in the top of the V5 loop.

Neutralizing Abs directed against CD4 binding site have been recently compared (Pietzsch et al., 2010). Around 30% of high titers of broadly HIV-neutralizing Abs expressed by memory B cells in HIV+ patients recognize one or more “core” epitopes that were not defined. Some of them recognize the ⁴⁷⁴DMR⁴⁷⁶ motif on the gp120 which is conserved in different strains and its mutation alters the viral fusion process. For example, HJ6 exhibit a breadth neutralizing activity comparable to, and could be considered as complementary to b12. HJ16 also showed selective neutralization (Corti et al., 2010).

3.1.2 CD4-induced region

The receptor-binding structures of gp120 are conserved among diverse viral isolates and represent functionally constrained regions that might serve as targets of broadly neutralizing antibodies. However, structural evidence suggests that, within functional spike, the CD4-binding site (CD4bs) is a recessed pocket and the co-receptor-binding site (CD4-induced region) is either not formed or not exposed until gp120 engages CD4 on target cells (Kwong et al., 1998). Numerous Abs were described for their binding to the CD4-induced site and the most interesting by their breadth neutralizing capacities are the 17b, X5, m18, and m14 which all contains long H3s playing a major role in their mechanism of binding

(table 1). The H3s region of X5, m6 and m9 appear to be very flexible and highly potent to neutralize the virus (Wen et al., 2010; Zhu et al., 2006)

3.1.3 V1/V2 regions

The V1/V2 loops are less investigated even if several studies have shown that the V1/V2 domain of the HIV-1 gp120 envelope protein is involved in viral tropism during infection. V1V2 region interfere by masking conserved neutralizing epitopes, in the conformational changes occurring after co-receptor binding.

As V1/V2 domain is highly glycosylated, numerous studies have determined the influence of carbohydrates on neutralizing antibodies production. As an example, mucosal secretory IgA from parotid saliva and also seric IgG from seropositives present differences in their neutralization properties in function of the clade and glycosylation state. (Granados-Gonzalez et al., 2009)

Epitope	Monoclonal antibody	Epitope on	Region(s) recognized	Epitope type
CD4-binding site	IgG1b12	Gp120	C2, C3, C4, V5 and C5	Discontinuous
	HJ16			
	VRC01			
	VRC03			
CD4-induced region	17b	Gp120	Binding Sheet	Discontinuous
	X5			
Complex carbohydrate	2G12	Gp120	Carbohydrate moieties in C2, C3 and V4	Discontinuous
	447/52-D			
V3	2219	Gp120	V3 loop	Linear (conformational)
	3074			
	HGN194			
Quaternary neutralizing epitope	2909	Gp120 Trimer	V2-V3	Quaternary
	PG9			
	PG16			
Membrane-proximal external region	2F5	Gp41	Protein and lipid	Linear (conformational)
	4E10			
	Z13			

Table 1. Main HIV-1 Env-specific neutralizing human monoclonal Abs.

3.1.4 V3 region

The b12 (CD4bs) and 2G12 (glycan) epitopes are presently the most attractive targets for vaccine design owing to their highly conserved nature. Although other sites seems present an interest in the immune response to gp120 as epitopes in the V3 region. This region is recognized by an antibody called 447- 52D (table 1) (Dhillon et al., 2008). Its core epitope is the Gly-Pro-Gly-Arg (GPGR) motif which is located at the center of the V3 region. This recognition is altered with the substitution of AA at the N-Term segment of the V3 region (Rosen et al., 2005). This Ab neutralize both X4 and R5 primary isolates, making it one of the most effective anti-V3 Ab. X-ray crystal structure of 447- 52D in complex with a V3 peptide indicates how this antibody may have the capacity to neutralize more clade B viruses than other anti-V3. Since the binding interaction between the antibody and the peptide is mediated by main chain contacts, which enlarges the ability of the antibody to recognize a variety of V3 sequences (Stanfield et al., 2004). The only side-chain interactions are with the Pro and Arg-residues in the GPGR sequence; the side chains from both residues form extensive interactions with

residues in the Ab combining site. The side chain of the Arg residue in the GPGR sequence is oriented in the opposite direction in the 447-52D complex relative to its orientation in the other complexes with anti-V3 antibodies and V3 (Binley et al., 2004; Rosen et al., 2005). However, exposure of the V3 region during infection seems to occur exclusively in the context of gp120 oligomer on the virus and may be influenced by the presence of glycan moieties. Given these caveats, the V3 region may be a target that only yields antibodies with restricted neutralizing ability. It is worth noting here that a 447-52D equivalent has not been identified so far for non-clade B viruses. A novel human monoclonal Ab HGN194 was isolated from memory B cells of a long-term non-progressor infected with a HIV-1 clade AG circulating recombinant form (CRF). This Ab recognizes a conformational epitope in the V3 and neutralizes all tier 1 viruses which are relatively neutralization-sensitive but only 11% of the tier 2 viruses tested. Tier 2 strains are more difficult to neutralize and reflect the majority of primary HIV-1 isolates. (Watkins et al., 2011) After massive immunization in Rhesus monkeys with the IgG1HGN194, the authors describe the absence of virus reservoirs after HGN194 was cleared. HGN194 seems to be an interesting cross-clade Nabs.

3.1.5 Impact of glycosylations

HIV uses glycans to occlude Ab epitopes on gp120. Around 50% of the molecule is covered with carbohydrates that render the underlying protein surface masked from the immune system and inaccessible (figure12). The virus can also shift the locations of its glycans *in vivo* (Nawaz et al., 2011). These observations gave a non static model called evolving glycan-shield model by which, through the continuous repositioning of its N-glycosylations positions, HIV is able to escape from a specific neutralizing Ab response. Thus, the developed resistance is not a comprehensive one but, instead, a specific adaptation to the particular Ab response in each infected individual (Wei et al., 2003). In addition to being involved in blocking neutralizing Ab responses, glycan repositioning also may compensate for conformational changes in the envelope glycoprotein caused by localized AA changes directly related to virus escape from neutralizing antibody. The works of Trkola led to the characterization of the human monoclonal Ab 2G12 directed against the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1. This antibody recognizes clustered $\alpha 1 \rightarrow 2$ -linked mannose residues on the distal ends of oligomannose sugars located on the carbohydrate-covered silent face of the gp120 outer domain. It confers neutralizing activity *in vitro* on T cells infected with HIV-1 primary isolates from clade A or B. This study has demonstrated the ability of 2G12 to induce an immune response as "antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC" directed against infected cells or by activation of the complement system (Trkola et al., 1996). The epitope of 2G12 is described as a dependent structure of N-glycans in the C2, C3, V3, V4 and C4 regions of gp120. Other studies have described that the epitope recognized by monoclonal antibody 2G12 contains mannose type glycans at multiple sites of N-glycosylation (Calarese et al., 2003; Scanlan et al., 2002). This is not aware that the glycosylated epitopes contain microheterogeneities at various carbohydrates which can lead to an escape from immune response. Only deletion of N392 glycosylation site is sufficient for decrease drastically 2G12 activities, which may explain the emergence of new strains viral resistance (Huskens et al., 2007; Scanlan et al., 2002).

3.1.6 Quaternary neutralizing epitope

Quaternary epitopes are formed by interactions between proteins during multimerization. It is as a result of such reorganization that many proteins (such as enzymes and the trimeric

gp120 spike of HIV-1) carry out their physiological function. An Ab that reacts with a true quaternary epitope will not interact with the individual monomeric subunits. Monoclonal antibodies mAb2909 and PG16 (figure 14), react with the trimeric form of gp120 on the surface of HIV-1 virions or *env*-transfected cells but not with monomeric gp120 (Gorny et al., 2005; Walker et al., 2009). However, some Abs that react with quaternary epitopes binds preferentially the trimers rather than monomeric subunits. This seems to be true for the monoclonal antibody PG9. Trimerization can result in changes in quaternary structure within individual subunits or through reorientation of the subunits against each other, so regions contributing to the quaternary epitope can be inter-molecular (*trans*) or intra-molecular (*cis*). Recently, a human mAb (mAb 2909) (figure 14) has been described to bind to a quaternary structure only on virion but not to soluble monomeric gp120 (Changela et al., 2011; Gorny et al., 2005). It has been discovered by immortalization of PBMC from HIV 1 patients asymptomatic and drug-naïve (Gorny et al., 1991). It demonstrates a high neutralizing activity for primary isolate such as SF162 (picomolar concentrations) and specificity for a complex epitope consisting of V2, V3, and the CD4 binding site that is present exclusively on the surfaces of intact virions but not on soluble viral proteins (Gorny et al., 2005). The neutralizing activity of MAb 2909 against pseudovirus SF162 is 750- to 100,000-fold more potent than those of other well-characterized. The occurrence of mAb 2909 suggests the possible existence of additional Abs that are oligomer-specific. Such Abs, in contrast to mAb2909, may possess broader neutralizing activity.

Moreover, two potent broadly neutralizing monoclonal antibodies, PG9 and PG16, have been discovered recently both targeting highly conformational, discontinuous epitopes involving the V2 and V3 loops (Walker et al., 2009). These antibodies have been characterized after a large screening of 1800 sera from HIV- and HIV+ donors from all over the world (Thailand, Australia, and United Kingdom etc). Only donors that exhibit broad and potent neutralizing serum activity were selected. Analysis of the antibody variable genes revealed two pairs of somatic variants, each one contained long, heavy-chain complementarity-determining region 3 (CDRH3) loops (PG9 and PG16). Long CDRH3 loops have been previously associated with polyreactivity. PG9 and PG16 are somatically related and appear to be derived from the same recombination of heavy and light chains. The both Abs recognize a site on gp120 composed of elements from the V2 and V3 variable regions. Despite the vaunted diversity of the HIV-1 gp120 envelope and the even higher sequence variability in the V2 and V3 regions (Walker et al., 2009), neutralization assays indicate that the recognized epitope is conserved in 70 to 80% of circulating viral isolates. Neutralization by PG9 correlates strongly with that of PG16, indicating that these Abs recognize a common HIV-1 epitope. This suggests that a common surface of the paratope on PG9 and PG16 might be involved in recognition of HIV-1. Substantial differences in sequence are found between PG9 and PG16 (Doria-Rose et al., 2010; Pancera et al., 2010).

3.2 Gp41 immunogenicity

Gp41 is largely occluded by quaternary interactions within native Env (Sougrat et al., 2007; Zanetti et al., 2006; Zhu et al., 2006). During the fusion process, different gp41 regions are exposed and elicit while the changing of conformation due to the interaction with gp120 antibodies. Some of them are very essential and present interesting capacities to block the infection and neutralizing the virus. The neutralizing Abs 2F5, Z13e1 and 4E10 directed against the membrane-proximal external region (MPER) in the C-Term portion of the gp41 ectodomain can bind Env and block a late stage of fusion (table 1) (Nelson et al., 2007;

Stiegler et al., 2001; Dimitrov et al., 2007; Zwick et al., 2005). Despite great efforts, high neutralizing Abs titers against any of the conserved sites on Env have not yet been elicited (Kim et al., 2007; Phogat and Wyatt, 2007).

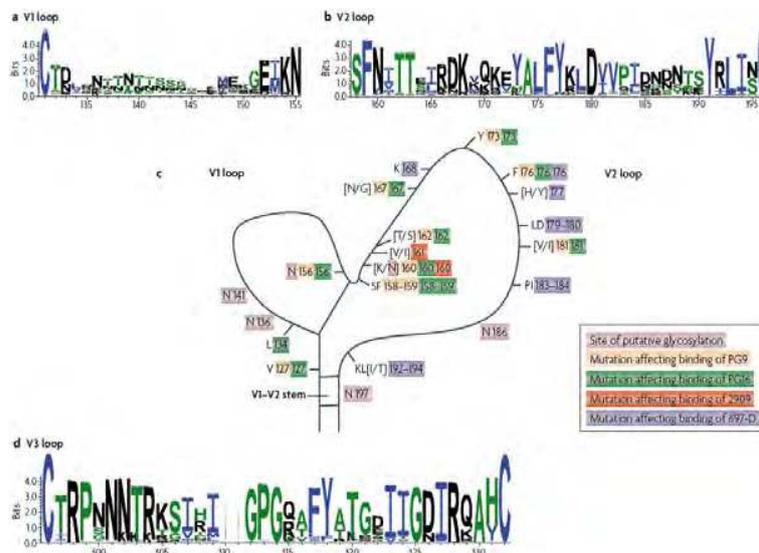


Fig. 14. Conserved and variable residues in the V1, V2 and V3 loops of gp120. A, b, d) Sequence logo describes the AA conservation pattern across a multiple alignment of many V1, V2 and V3 loops. The height of the letter indicates the degree of conservation of the most common amino acid at that position. Data obtained from the Los Alamos National Laboratory, New Mexico, USA. AA are colored according to their chemical properties. C) AA positions and sites of glycosylation that are implicated in binding of the V2-specific monoclonal Ab 697-D and the Quaternary Neutralizing epitopes-specific monoclonal Abs PG9, PG16 and 2909 are mapped onto a schematic illustration. Square brackets indicate more than one commonly occurring AA at a single position. The individual sites associated with binding of each single Ab are distributed throughout the V1-V2 primary sequence linearly but, in 3D space, must group into one or a few overlapping epitopes (adapted from (Zolla-Pazner and Cardozo, 2010)

3.2.1 Polar region (PR)

Only one study described PR-specific Abs in HIV-1+ patients. However, these Abs remains poorly neutralizing (Buchacher et al., 1994).

3.2.2 N-Heptad Repeat region

Cross-reactive antibodies to the NHR have been detected in HIV-1-positive sera, indicating its immunogenic characteristics (Poumbourios et al., 1992). Moreover, the D5 NAb was generated from a native single-chain variable fragment library. D5 has been shown to bind to the NHR trimer and, like the T-20 peptide, inhibits the assembly of the fusion intermediate *in vitro* (Miller et al., 2005). Those studies indicate the potential of the inner NHR trimer as a target for vaccine design. D5 was derived from B cells of HIV-naive subjects and has not been subject to

extensive somatic hypermutation, with only seven non-complementarity-determining regions (CDR) amino acid changes from germline sequences (four changes in VH and three in VL). Unlike b12, 2F5, and 4E10, D5 does not have an atypically long heavy chain CDR3 region. Unlike 2G12, D5 does not require a “domain-swapped” structure for neutralization. Unlike X5, D5 retains antiviral activity against primary HIV isolates when converted to an IgG1 format. Finally, and most importantly, D5 was elected by binding to IZN36 and 5H which are synthetic antigens with well defined structures mimicing the 6 helix bundle structure. In addition, new NAb with limited potency against the NHR trimer of HIV-1 have been isolated by screening phage-display library (Nelson et al., 2008). Ag-binding and monoclonal Ab-competition experiments using 8K8, DN9 and D5 strongly suggest that the epitopes of 8K8 and DN9 are more closely related to each other than to that of D5. Although, D5 has a preference to bind NHR mimetics in the absence of CHR peptide thus indicating a significant cross-reactivity of D5 with immobilized 6-Helix (Luftig et al., 2006; Miller et al., 2005). Similarly, C34 HR2 peptide competes efficiently with 8K8 and DN9 binding to immobilized NHR mimetics (e.g. 5-Helix and IZN36), but not with D5. Another antibody, Fab 3764, has been shown to bind to the NHR region with the same efficiency on free (N35CCG-N13) or interacting with CHR peptide in the form of a 6-Helix Bundle (Gustchina et al., 2007; Gustchina et al., 2010). Further more absence of detectable cardiolipin reactivity with 8K8 178 170–183 suggests that autoreactivity, at least to cardiolipin cannot explain the weak titers of 8K8-like Abs in the rabbits (Haynes et al., 2005; Scherer et al., 2007). Three-dimensional structural informations of the mAb-mimetic complexes may be used to better predict the accessibility to the NHR on fusogenic gp41 for prospective next-generation Abs. Recently, the HK20 gp41-specific antibody was obtained from immortalized memory B cells of an HIV-1 infected individual (Corti et al., 2010). This Ab targets the conserved hydrophobic pocket in HR1. Crystal structure of HR1-specific human mAb HK20 in complex with 5-Helix shows that HK20 binds to the same region recognized by D5 but differs significantly in the contact sites and shows a role for somatic mutations in affinity maturation (Luftig et al., 2006). These aspects influence both potency and breadth of neutralization, which are higher for HK20 compared to D5 and depend on somatically mutated residues. In addition, we show that in case of HK20 the scFv is at least 15-fold more potent in neutralization than IgG, consistent with a limited accessibility to the target site. The gp41 footprints of HK20 and D5 and the global structural principles employed by both antibodies are similar.

3.2.3 Immunodominant loop

This region located between the two heptad repeat region N-HR and C-HR was identified during serum-mapping studies (reviewed in Girard et al., 2006; Montero et al., 2008). Even if the response to this region is very frequent most of the Abs elicited do not present neutralization capacities but instead shown enhancement of infection (Robinson et al., 1990). Only one MAAb (clone3) neutralize T-cell laboratory adapted viruses from clade B and three primary isolates from group O (Ferrantelli et al., 2004).

3.2.4 C-Heptad repeat region (C-HR)

Considering that MPER is not included in C-HR, no CHR-specific Ab has been described. The poor immunogenicity of this region may be attributed to its lack of exposure on the surface of the native virus and is exposed only if gp120/CD4 interaction occurred. This region is probably masked by gp120 (Nyambi et al., 2000; Pietzsch et al., 2010).

3.2.5 Fusogenic 6 helix-bundle form

The gp41 TM subunit, which anchors the spikes in the viral envelope, maintains their trimeric organization, and plays a major role in fusion of the virus and host cell membrane through its hydrophobic N-Term fusion peptide and a fusion active hairpin structure involving the HR that can fold into a six-helix coiled-coil bundle. This pattern plays an important role in both the early and late stages of the membrane fusion (Chan and Kim, 1998; Johnson et al., 2001; Liu et al., 2005; Lu et al., 1995; Munoz-Barroso et al., 1998). This process can also participate in the formation of the fusion pore through direct protein-membrane interactions (Munoz-Barroso et al., 1998; Shnaper et al., 2004). Different studies have shown the immunogenicity of the fusogenic complex and describe Abs direct against this structure (Gustchina et al., 2010; Opalka et al., 2004; Vincent et al., 2008). Authors were confronted to the difficulty of the construction of a native form of the fusogenic complex with 6 helix-bundle and used a five helix-bundle (Gustchina et al., 2010) or synthetic peptide that mimic the N-HR like (peptide N36) or mimic C-HR (peptides C34 or T20). Abs directed against the complex do not always recognize the HR1 or HR2 individually. The Abs have shown low neutralizing activity excepted in one study with Nabs against primary isolates (Vincent et al., 2008), and the work of Gustchina *et al.*, with a monoclonal antibody Fab 3674 that neutralize diverse laboratory-adapted B strains of HIV-1 and primary isolates of subtypes A, B, and C (Gustchina et al., 2007). When gp41 switches from the native conformation to the fusion structure, there are probably several intermediate structures, which can be a target for Abs. Several studies indicate that the prehairpin intermediate state is accessible to Abs and that the access is not restricted (Louis et al., 2003). Therefore, the gp41 6-HB core may serve as an attractive target for development of anti-HIV molecules.

3.2.6 MPER (membrane-proximal external region)

The Membrane Proximal Ectodomain Region contains the epitopes of three broadly neutralizing Abs, 2F5, 4E10, and Z13 (Buchacher et al., 1994; Zwick et al., 2001) (figure 15). MPER is not highly immunogenic like the N-HR, ID loop or the gp120. Specific anti-MPER Abs present in natural infection are not as broadly neutralizing as 2F5, 4E10 (Braibant et al., 2006; Muhlbacher et al., 1999). Both 2F5 and 4E10 neutralize a broad range of both laboratory adapted and primate isolates of HIV-1 (Mascola et al., 2000; Stiegler et al., 2001). 2F5 is the most potent NAb, whereas 4E10 neutralizes a broader range of HIV-1 isolates, as shown by pseudovirus studies using an extensive panel of Envs derived from primary isolates (Binley et al., 2004). The 2F5 Ab could also be detected at low level in the sera of HIV long term progressors (Braibant et al., 2006). The frequency of seroreactivity to MPER is about 56% in 50 HIV-1-positive subjects. Most of the Abs are specific for the C-Term region of the ELDKWA sequence just preceding the 2F5 epitope. In addition, more than 30% of sera were reactive to the ELDKWA 2F5 epitope. Furthermore, serum reactivity against an MPER peptide (aa 642 to 673) in patients could be correlated to the recognition of infected T cells and to CD4 cell counts (Muhlbacher et al., 1999). There is a possibility that NAbs against MPER are present in low titers or with low affinities in serum that they are not sufficiently neutralizing to inhibit HIV-1 infection and are therefore undetectable in neutralization assays. However, recent studies using chimeric pseudoviruses with epitopes in a context more closely related to the MPER structure (figure 15B) suggest that MPER-specific NABs are relatively rare or absent during natural infection. Moreover, the fact that new NABs are mapping to a different region in MPER than 2F5 and 4E10 provides hopes by suggesting that vaccine-induced neutralizing antibodies are achievable (Haynes and Montefiori, 2006;

Li et al., 2006). To date, the lack of broadly neutralizing activity shown by MPER binding sera could be due to low titers or absence of NAb. This issue of quantity *versus* quality has not been fully resolved but has significant implications for vaccine design.

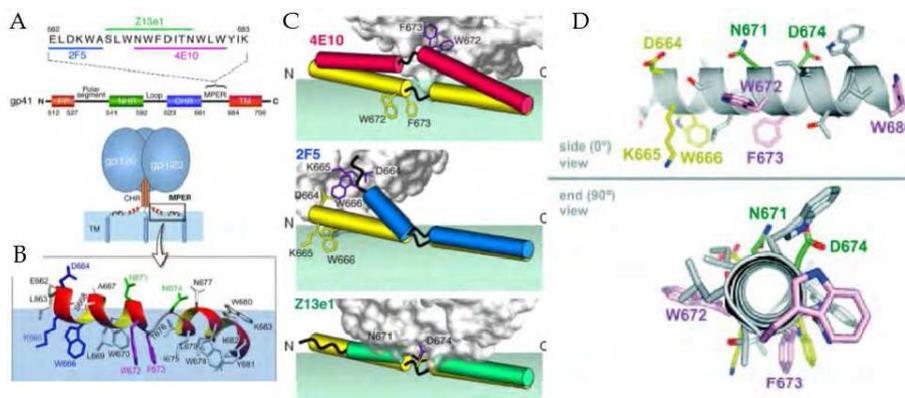


Fig. 15. Different representations of MPER interaction with 2F5, 4E10 and Z13e1 Abs. A) Schematic diagram of HIV-1 gp41. FP, fusion peptide region; NHR and CHR, N- and C-terminal-helices of heptad repeat, respectively; and TM, transmembrane domain. The minimal peptide epitopes are indicated for 2F5 (blue), Z13e1 (green), and 4E10 (magenta). B) A simple model of env including MPER and TM based on 3D structural features of HIV-1/SIV-1 trimeric env and the NMR structure of the HxB2 MPER in a virion mimic surface (blue plane). N674 rather than D674 is shown. C) Artistic rendering of MPER orientation changes induced by 4E10, 2F5, and Z13e1. Unbound MPER peptides (yellow tubes) are immersed in the lipid bilayers (light green panel). Red, blue, and green tubes represent the membrane orientation of schematic MPER segments in complex with 4E10, 2F5, and Z13e1 (gray surface area). Several key binding residues positions are indicated before (yellow) and after (purple) antibody binding (Song et al., 2009). D) Hypothetical model of the MPER (DKWASLWNWFDITNWLW) and the 2F5, Z13e1 and 4E10 core epitopes with the core residues colored in yellow, green and violet, respectively described by (Nelson et al., 2007).

As said before 2F5 Ab has broad neutralizing activity. In animal models it could interrupt the mucosal transmission and confers protection against SHIV infection (Mascola et al., 2000). The 2F5 antibody was isolated from human immortalized B cells. It recognizes an epitope lying between glutamic acid 662 and alanine 667 (ELDKWA). Studies have shown, for expression library and protection against proteases, that this epitope is wider (EQELLELDKWASLWN). By addition of a leucine at each side (LELDKWASL), the affinity for its epitope is increased by more than 2000 times (Ofek et al., 2004; Parker et al., 2001; Tian et al., 2002). In models that study the involvement of the viral membrane using POPC (1-oleyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and POPC/cholesterol in the recognition and binding to its epitope, it has been shown that 2F5 does not interact with the membrane before fixation (Veiga and Castanho, 2006). In the absence of an hydrophobic environment, 2F5 and 4E10 are unable to bind to MPER (Ofek et al., 2004). This study demonstrates that the recognition of 2F5 and 4E10 epitopes depend on their integrity and conformational context. Recently, it was shown that the binding of 2F5 causes peptide

docking on the membrane and increase the ability of the Mab to be intrusive (Franquelim et al., 2011). The 2F5 induces a confined local disorder in the membrane which can promote the exposure and interaction with gp41. However, the role of the presence of lipids in recognition of epitopes during the membrane fusion has not yet been clearly elucidated. The 2F5 epitope contains a β -turn conformation and antigen which is presented in a similar context may better mimic the epitope and consequently improve the binding of this Ab (Tian et al., 2002). Several difficulties rise to make a stable immunogen, flexible and mimicking faithfully the MPER in a native conformation sported during the steps of rapprochement and viral fusion process. Moreover, the polyspecificity of 2F5 and 4E10 and autoreactivity by binding to cardiolipin could explain the low activity of these antibodies *in vivo* as the immune system deplete all B cells which produce auto-reactive Abs (Haynes et al., 2005).

Another promising MPER-specific Ab (4E10) was isolated from B cells of HIV patients. It binds a deeper epitope in the MPER and presents neutralizing abilities. The 4E10 is highly protective against infection with primary isolates and laboratory strains of HIV-1. The 4E10 binds to a highly conserved linear epitope on MPER ⁶⁷¹NWF (D/N) IT⁶⁷⁶ (Zwick et al., 2001). Crystallographic structures of the epitope have been characterized and form a large helical shape with all the important AA on the same side of the helix (Hager-Braun and Tomer, 2005) (figure 15D). The antigen reacts only with residues of the base and the center of the loop of CDR H3. However much of this loop is not involved in its binding to the antigen. The top of the loop of CDR H3 of 4E10 and this residue is removed from the apolar binding site epitope which suggest a possible interaction with the membrane of the virus. Structural models predict that the formation of the epitope of 2F5 and 4E10 would be highly dependent on the presence of a membrane. The affinity of 4E10 increases in the presence of lipids (Lorizate et al., 2006). The W⁶⁷², F⁶⁷³, T⁶⁷⁶ residues seems to be crucial for 4E10 binding since their substitution by alanine residues reduce drastically the affinity (Brunel et al., 2006). The sequence ⁶⁷¹NWFDITNWLWYIK⁶⁸³ is optimal for 4E10 recognition. In resistant strains, the pattern NWF(N/D)IT indicate that the 4E10 epitope is more complex and would be even discontinuous (Hager-Braun and Tomer, 2005). Mass spectrometry studies reveal that 4E10 binds to the N-Term of gp120 and gp41 on the native conformation (Stiegler et al., 2001). It has been suggested that the pattern NWF (N/D)IT forms a cryptic epitope accessible only during the intermediate stages of the merger. It seems that 4E10 has higher affinity to the membrane than 2F5 and that unlike 2F5, 4E10 promotes peptide extraction from the bilayer lipid membrane (Franquelim et al., 2011). The 4E10 Ab has also a polyspecificity for autoantigens as histone or DNA in systemic lupus erythematosus. Several *in vivo* pharmacokinetic studies and phase I/II clinical trials phases I and II with combination of 4E10, 2F5 and 2G12 showed that these three Abs are able to maintain undetectable viral load in patients where the infection has been suppressed by antiviral therapy (Joos et al., 2006). These studies also showed that 4E10 administration is not highly immunogenic with rare IgM against 4E10 but no IgG. Clearance and half-life of 4E10 are identical to those of other classical therapeutic Abs.

One other described MPER-specific Ab is the Z13 Fab. This Ab derived from an expression library recognizes an epitope located on the C-Term of 2F5 epitope and which overlaps 4E10 epitope. The epitope of Z13 is centered around the sequence ⁶⁷¹NWFDIT⁶⁷⁶ but this would be dependent on the conformation of this motif and changes such as N-glycosylation of asparagine (D) ⁶⁷⁴ or exposure to a native protein (Zwick et al., 2001). This Ab is able to neutralize weakly several clades such as B, C and D.

3.2.7 The C-Term tail

The external tail loop within the CT of the gp41 TM subunit of the HIV-1 envelope protein comprises approximately 40 AA, and within are 18 AA (⁷³⁴PDRPEGIEEEGGGERDRDR⁷⁵¹) including three interesting regions. The antigenicity of this segment of the CT is very complex, and changes according to the biological context of gp41 (Reading et al., 2003). The Kennedy sequence, ⁷³¹PRGPDRPEGIEEEGGGERDRDRS⁷⁵², is exposed on the outer surface (Kennedy et al., 1986). It was observed that 3 epitopes ⁷³⁴PDRPEG⁷³⁹, ⁷⁴⁰IEEE⁷⁴³, ⁷⁴⁶ERDRD⁷⁵⁰ are mostly recognized in the Kennedy sequences (Chen et al., 2001; McLain et al., 2001). Kennedy-specific NAbs could be elicited in different conditions of exposure.

The ⁷⁴⁶ERDRD⁷⁵⁰ epitope is exposed constitutively and does not require contact with cell receptors or an elevated temperature (Cleveland et al., 2003). ⁷³⁴PDRPEG⁷³⁹ is recognised by the non-neutralizing Ab C8, ⁷⁴⁰IEEE⁷⁴³ by the non-neutralizing Ab 1575 (Abacioglu et al., 1994), ⁷⁴⁶ERDRD⁷⁵⁰ by the non-neutralising Abs 1577 and 1583 (Vella et al., 1993), and the neutralizing EPES (epitope purified and ERDRD specific) and SAR1 antibodies. EPES and SAR1 Abs were both obtained by immunisation of mice with cowpea mosaic virus (CPMV) chimeras expressing short, ERDRD-containing gp41 sequences. EPES is the only Kennedy-specific polyclonal IgG described to have a strong neutralizing activity against primary isolates. It was also shown that some of the IgA from infected patients parotid saliva or sera are able to recognize the linear peptides ⁷³¹PEGIEEEGGGERDRDTSGR⁷⁵⁰ or ⁷⁴¹RDRDTSGR⁷⁵⁰VHGFLAIWVD⁷⁶² (Vincent et al., 2004). IEEE epitope is antigenically dominant, and competes with the binding of ERDRD-specific antibodies. This situation in humans is not known. It is interesting that MAb 1575 appears to have no biological activity other than suppression of the antibody response to ERDRD. Furthermore, the sequence ERDRD is involved in at least three epitopes. These epitopes may be occulted or exposed as a result of conformational changes occurring in another part of gp41, or may be hidden by the associated gp120 and exposed when that gp120 is shed. In addition epitopes may be modulated by conformational changes that affect the ERDRD sequence directly. (Hollier & Dimmock, 2005).

4. Conclusions

The development of an HIV vaccine has proven to be a formidable scientific challenge given the extreme genetic variability of the virus, lack of good animal models, lack of knowledge of all mechanisms involved in immunity or limitations of the technology. However, passive administration of rare human anti-Env monoclonal broadly neutralizing antibodies with titers that can be achieved by immunization can protect against SHIV challenge in rhesus macaques (Hessell et al., 2007; Hessell et al., 2009a; Mascola and Montefiori, 2010; Montefiori and Mascola, 2009). Thus, a major goal of HIV-1 vaccine development is to design highly immunogenic Env antigens capable of inducing Abs that can broadly neutralize HIV-1 (Mascola and Montefiori, 2010; Stamatatos et al., 2009).

According to the clinicaltrials.gov database, more than 543 clinical trials were performed in the field of HIV vaccines. During these last ten years, only one vaccine candidate seems to give objective protection. This prophylactic vaccine from Sanofi Pasteur is composed by a heterologous prime-boost vaccine with a priming with VaxGen gp120 B/E (AIDSVAX B/E) protein and a boost with live recombinant ALVAC-HIV (vCP1521). This trial (RV144) has involved 16,403 individuals and was conducted in Thailand and completed in October 2009. Vaccination appeared to reduce about 31.2% the rate of acquisition of HIV-1 infection but

had no significant effect on viral loads or on CD4+ T cell counts. This “weak” efficacy is the first indication that effective vaccination against HIV-1 could be reached and give reason for hopes in the development of anti-HIV vaccines. The immunological correlates in this trial indicate that induction of Nabs is important for vaccine efficacy but not sufficient. Induction of polyspecific virus-specific CD8+ T cell responses is also an important actor of vaccine efficacy. So the scope of action that remains for an effective vaccination is restricted to early stages of infection before the virus infects lymphoid organs and mucosal tissue. In addition, HIV has developed during its evolution, an immune system circumvent strategies that really works. The data from human clinical trials demonstrate that the first generation of soluble protein and vectored Env immunogens was safe and immunogenic. However, generated Abs are only effective on highly sensitive strains of HIV-1. One of the major goal in the development of an effective vaccine remain to develop a mimetic immunogen similar to viral proteins as the most accurate meaning can replicate all possible conformations in steps of infection. Indeed, conserved Env epitopes targeted by NAbs are poorly immunogenic because they either are masked by glycan similar to host carbohydrates (Binley et al., 2010; Wei et al., 2003), appear transiently (Frey et al., 2008), are sterically hindered (Schieff et al., 2009), or must overcome entropy for Ab binding. Another important point is that conserved epitopes (more in the gp41) present homologies with self-proteins which could trigger tolerance mechanisms (Haynes et al., 2005; Verkoczy et al., 2010). Finally, even when Abs can neutralize the infecting strains, their effect is transient due to escape mutations (Richman et al., 2003; Wei et al., 2003). Thus, immunization of non-human primates and humans with HIV-1 Env monomers or trimers has failed to induce broadly NAbs. Induced Abs are mainly effective on easily neutralized strains also called Tier 1 strains but have weak neutralization abilities for Tier 2 and Tier 3 strains (Gilbert et al., 2010; Mascola and Montefiori, 2010). The explanation for the poor cross-reactivity of vaccine-elicited Nabs appears to be related to the restricted repertoire of induced Abs and to the complexity of the native viral spike structure. NAbs against HIV-1 play an important role in preventing viral infections. Less clear is their role in the containment of viral replication in infected individuals.

However, evidence is accumulating that NAbs may help the cellular arm of the immune response to prevent or delay the progression to AIDS. Detection of NAbs depends on the *in vitro* neutralization assays used, and standardization of the assays is essential in order to be able to compare the magnitude and quality of a NAb response in sera or other fluids from HIV-infected patients, uninfected HIV-1 exposed persons, or vaccinated animals/persons. Viral mechanisms to prevent neutralization include high variability and extensive glycosylation of the Envelope proteins, Envelope trimerization and shedding as well as late exposure of functionally important entry domains by conformational changes induced upon CD4 binding. These are also the difficulties encountered in the design of immunogens able to induce neutralizing antibodies upon vaccination.

5. Acknowledgements

We would like to thank the Cluster 10 of Infectiology of the region Rhône-Alpes and Sidaction to fund our works.

6. References

- Abacioglu, Y.H., Fouts, T.R., Laman, J.D., Claassen, E., Pincus, S.H., Moore, J.P., Roby, C.A., Kamin-Lewis, R., and Lewis, G.K. (1994). Epitope mapping and topology of

- baculovirus-expressed HIV-1 gp160 determined with a panel of murine monoclonal antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 371-381.
- Alfsen, A., and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 25649-25659.
- Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 787-820.
- Alter, G., Martin, M.P., Teigen, N., Carr, W.H., Suscovich, T.J., Schneidewind, A., Streeck, H., Waring, M., Meier, A., Brander, C., *et al.* (2007). Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J. Exp. Med.* 204, 3027-3036.
- Alter, G., and Moody, M.A. (2010). The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J. Infect. Dis.* 202 *Suppl* 2, S315-22.
- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A., *et al.* (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* 9, 301-309.
- Bewley, C.A., Louis, J.M., Ghirlando, R., and Clore, G.M. (2002). Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J. Biol. Chem.* 277, 14238-14245.
- Binley, J.M., Ban, Y.E., Crooks, E.T., Eggink, D., Osawa, K., Schief, W.R., and Sanders, R.W. (2010). Role of complex carbohydrates in HIV-1 infection and resistance to antibody neutralization. *J. Virol.* 84, 5637-5655.
- Binley, J.M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M.B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., Petropoulos, C.J., and Burton, D.R. (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-HIV-1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* 78, 13232-13252.
- Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H., Autran, B., and Barin, F. (2006). Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS* 20, 1923-1930.
- Briggs, J.A., Riches, J.D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G., and Krausslich, H.G. (2009). Structure and assembly of immature HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11090-11095.
- Brunel, F.M., Zwick, M.B., Cardoso, R.M., Nelson, J.D., Wilson, I.A., Burton, D.R., and Dawson, P.E. (2006). Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing HIV-1 antibody. *J. Virol.* 80, 1680-1687.
- Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, W., Trkola, A., Purtscher, M., Gruber, G., Tauer, C., Steindl, F., and Jungbauer, A. (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 359-369.

- Buzon, V., Padros, E., and Cladera, J. (2005). Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry* 44, 13354-13364.
- Caffrey, M., Braddock, D.T., Louis, J.M., Abu-Asab, M.A., Kingma, D., Liotta, L., Tsokos, M., Tresser, N., Pannell, L.K., Watts, N., *et al.* (2000). Biophysical characterization of gp41 aggregates suggests a model for the molecular mechanism of HIV-associated neurological damage and dementia. *J. Biol. Chem.* 275, 19877-19882.
- Calarese, D.A., Scarlan, C.N., Zwick, M.B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Roux, K.H., *et al.* (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300, 2065-2071.
- Cambi, A., de Lange, F., van Maarseveen, N.M., Nijhuis, M., Joosten, B., van Dijk, E.M., de Bakker, B.I., Fransen, J.A., Bovee-Geurts, P.H., van Leeuwen, F.N., Van Hulst, N.F., and Figdor, C.G. (2004). Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J. Cell Biol.* 164, 145-155.
- Campbell, S.M., Crowe, S.M., and Mak, J. (2001). Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* 22, 217-227.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-273.
- Chan, D.C., and Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 681-684.
- Changela, A., Wu, X., Yang, Y., Zhang, B., Zhu, J., Nardone, G.A., O'Dell, S., Pancera, M., Gorny, M.K., Phogat, S., *et al.* (2011). Crystal structure of human antibody 2909 reveals conserved features of quaternary structure-specific antibodies that potently neutralize HIV-1. *J. Virol.* 85, 2524-2535.
- Chen, S.S., Lee, S.F., and Wang, C.T. (2001). Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of HIV-1 envelope transmembrane protein gp41. *J. Virol.* 75, 9925-9938.
- Cleveland, S.M., McLain, L., Cheung, L., Jones, T.D., Hollier, M., and Dimmock, N.J. (2003). A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of HIV-1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion. *J. Gen. Virol.* 84, 591-602.
- Cormier, E.G., and Dragic, T. (2002). The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in HIV-1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.* 76, 8953-8957.
- Corti, D., Langedijk, J.P., Hinz, A., Seaman, M.S., Vanzetta, F., Fernandez-Rodriguez, B.M., Silacci, C., Pinna, D., Jarrossay, D., Balla-Jhagjhoorsingh, S., *et al.* (2010). Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 5, e8805.
- Davis, K.L., Gray, E.S., Moore, P.L., Decker, J.M., Salomon, A., Montefiori, D.C., Graham, B.S., Keefer, M.C., Pinter, A., Morris, L., Hahn, B.H., and Shaw, G.M. (2009). High titer HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination. *Virology* 387, 414-426.

- Del Angel, V.D., Dupuis, F., Mornon, J.P., and Callebaut, I. (2002). Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1153-1160.
- Delahunty, M.D., Rhee, I., Freed, E.O., and Bonifacino, J.S. (1996). Mutational analysis of the fusion peptide of the HIV-1: identification of critical glycine residues. *Virology* 218, 94-102.
- Dhillon, A.K., Stanfield, R.L., Gorny, M.K., Williams, C., Zolla-Pazner, S., and Wilson, I.A. (2008). Structure determination of an anti-HIV-1 Fab 447-52D-peptide complex from an epitaxially twinned data set. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* D64, 792-802.
- Dimitrov, A.S., Jacobs, A., Finnegan, C.M., Stiegler, G., Katinger, H., and Blumenthal, R. (2007). Exposure of the membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Biochemistry* 46, 1398-1401.
- 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., and 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.
- Dubay, J.W., Roberts, S.J., Brody, B., and Hunter, E. (1992). Mutations in the leucine zipper of the HIV-1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* 66, 4748-4756.
- Durell, S.R., Martin, I., Ruyschaert, J.M., Shai, Y., and Blumenthal, R. (1997). What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review). *Mol. Membr. Biol.* 14, 97-112.
- Dwyer, J.J., Hasan, A., Wilson, K.L., White, J.M., Matthews, T.J., and Delmedico, M.K. (2003). The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N-terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for six-helix bundle formation. *Biochemistry* 42, 4945-4953.
- Edwards, T.G., Wyss, S., Reeves, J.D., Zolla-Pazner, S., Hoxie, J.A., Doms, R.W., and Baribaud, F. (2002). Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of HIV-1 envelope protein. *J. Virol.* 76, 2683-2691.
- Fantini, J., Hammache, D., Delezay, O., Yahi, N., Andre-Barres, C., Rico-Lattes, I., and Lattes, A. (1997). Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion and entry. *J. Biol. Chem.* 272, 7245-7252.
- Ferrantelli, F., Kitabwalla, M., Rasmussen, R.A., Cao, C., Chou, T.C., Katinger, H., Stiegler, G., Cavacini, L.A., Bai, Y., Cotropia, J., Ugen, K.E., and Ruprecht, R.M. (2004). Potent cross-group neutralization of primary HIV-1 isolates with monoclonal antibodies—implications for acquired immunodeficiency syndrome vaccine. *J. Infect. Dis.* 189, 71-74.
- Fischer, W., Ganusov, V.V., Giorgi, E.E., Hraber, P.T., Keele, B.F., Leitner, T., Han, C.S., Gleasner, C.D., Green, L., Lo, C.C., *et al.* (2010). Transmission of single HIV-1

- genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 5, e12303.
- Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S.E., Cantin, C., Hendrickson, W.A., and Sekaly, R.P. (1991). Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 66, 1037-1049.
- Franquelim, H.G., Chiantia, S., Veiga, A.S., Santos, N.C., Schwille, P., and Castanho, M.A. (2011). Anti-HIV-1 antibodies 2F5 and 4E10 interact differently with lipids to bind their epitopes. *AIDS* 25, 419-428.
- Frey, G., Peng, H., Rits-Volloch, S., Morelli, M., Cheng, Y., and Chen, B. (2008). A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3739-3744.
- Gallaher, W.R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50, 327-328.
- Gangupomu, V.K., and Abrams, C.F. (2010). All-atom models of the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 from metadynamics. *Biophys. J.* 99, 3438-3444.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.
- Gilbert, P., Wang, M., Wrin, T., Petropoulos, C., Gurwith, M., Sinangil, F., D'Souza, P., Rodriguez-Chavez, I.R., DeCamp, A., Giganti, M., *et al.* (2010). Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. *J. Infect. Dis.* 202, 595-605.
- Girard, M.P., Osmanov, S.K., and Kieny, M.P. (2006). A review of vaccine research and development: the HIV. *Vaccine* 24, 4062-4081.
- Gnann, J.W., Jr, Nelson, J.A., and Oldstone, M.B. (1987). Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 61, 2639-2641.
- Goonetilleke, N., Liu, M.K., Salazar-Gonzalez, J.F., Ferrari, G., Giorgi, E., Gantsov, V.V., Keele, B.F., Learn, G.H., Turnbull, E.L., Salazar, M.G., *et al.* (2009). The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 206, 1253-1272.
- Gordon, L.M., Mobley, P.W., Pilpa, R., Sherman, M.A., and Waring, A.J. (2002). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using ¹³C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 96-120.
- Gordon, L.M., Nisthal, A., Lee, A.B., Eskandari, S., Ruchala, P., Jung, C.L., Waring, A.J., and Mobley, P.W. (2008). Structural and functional properties of peptides based on the

- N-terminus of HIV-1 gp41 and the C-terminus of the amyloid-beta protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 2127-2137.
- Gorny, M.K., Stamatatos, L., Volsky, B., Revesz, K., Williams, C., Wang, X.H., Cohen, S., Staudinger, R., and Zolla-Pazner, S. (2005). Identification of a new quaternary neutralizing epitope on HIV-1 virus particles. *J. Virol.* 79, 5232-5237.
- Gorny, M.K., Xu, J.Y., Gianakakos, V., Karwowska, S., Williams, C., Sheppard, H.W., Hanson, C.V., and Zolla-Pazner, S. (1991). Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3238-3242.
- Granados-Gonzalez, V., Piedrahita, L.D., Martinez, M., Genin, C., Riffard, S., and Urcuqui-Inchima, S. (2009). Role of the HIV-1 gp120 V1/V2 domains in the induction of neutralizing antibodies]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27, 523-530.
- Gustchina, E., Li, M., Louis, J.M., Anderson, D.E., Lloyd, J., Frisch, C., Bewley, C.A., Gustchina, A., Wlodawer, A., and Clore, G.M. (2010). Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS Pathog.* 6, e1001182.
- Gustchina, E., Louis, J.M., Lam, S.N., Bewley, C.A., and Clore, G.M. (2007). A monoclonal Fab derived from a human nonimmune phage library reveals a new epitope on gp41 and neutralizes diverse HIV-1 strains. *J. Virol.* 81, 12946-12953.
- Hager-Braun, C., and Tomer, K.B. (2005). Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* 2, 745-756.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360, 358-361.
- Harouse, J.M., Collman, R.G., and Gonzalez-Scarano, F. (1995). HIV-1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfo-galactosyl ceramide-positive cell line. *J. Virol.* 69, 7383-7390.
- Hartley, O., Klasse, P.J., Sattentau, Q.J., and Moore, J.P. (2005). V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 171-189.
- Haynes, B.F., Fleming, J., St Clair, E.W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scarce, R.M., Plonk, K., Staats, H.F., *et al.* (2005). Cardioplipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308, 1906-1908.
- Haynes, B.F., and Montefiori, D.C. (2006). Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates. *Expert Rev. Vaccines* 5, 579-595.
- Haynes, B.F., Moody, M.A., Verkoczy, L., Kelsoe, G., and Alam, S.M. (2005). Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis. *Hum. Antibodies* 14, 59-67.
- Hessell, A.J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C.E., Beurskens, F.J., Bakker, J.M., Lanigan, C.M., Landucci, G., Forthal, D.N., Parren, P.W., Marx, P.A., and Burton, D.R. (2007). Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 449, 101-104.
- Hessell, A.J., Poignard, P., Hunter, M., Hangartner, L., Tehrani, D.M., Bleeker, W.K., Parren, P.W., Marx, P.A., and Burton, D.R. (2009a). Effective, low-titer antibody protection

- against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat. Med.* 15, 951-954.
- Hessell, A.J., Rakasz, E.G., Pognard, P., Hangartner, L., Landucci, G., Forthal, D.N., Koff, W.C., Watkins, D.I., and Burton, D.R. (2009b). Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog.* 5, e1000433.
- Hollier, M.J., and Dimmock, N.J. (2005). The C-terminal tail of the gp41 transmembrane envelope glycoprotein of HIV-1 clades A, B, C, and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure, and function. *Virology* 337, 284-296.
- Huang, C.C., Tang, M., Zhang, M.Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R.L., Dimitrov, D.S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I.A., Wyatt, R., and Kwong, P.D. (2005). Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310, 1025-1028.
- Huskens, D., Van Laethem, K., Vermeire, K., Balzarini, J., and Schols, D. (2007). Resistance of HIV-1 to the broadly HIV-1-neutralizing, anti-carbohydrate antibody 2G12. *Virology* 360, 294-304.
- Johnson, W.E., Sauvron, J.M., and Desrosiers, R.C. (2001). Conserved, N-linked carbohydrates of HIV-1 gp41 are largely dispensable for viral replication. *J. Virol.* 75, 11426-11436.
- Joos, B., Trkola, A., Kuster, H., Aceto, L., Fischer, M., Stiegler, G., Armbruster, C., Vcelar, B., Katinger, H., and Gunthard, H.F. (2006). Long-term multiple-dose pharmacokinetics of human monoclonal antibodies (MAbs) against HIV-1 envelope gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1773-1779.
- Kamath, S., and Wong, T.C. (2002). Membrane structure of the HIVgp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 83, 135-143.
- Karlsson Hedestam, G.B., Fouchier, R.A., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J., and Wyatt, R.T. (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 143-155.
- Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., *et al.* (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7552-7557.
- Kennedy, R.C., Henkel, R.D., Pauletti, D., Allan, J.S., Lee, T.H., Essex, M., and Dreesman, G.R. (1986). Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope glycoprotein. *Science* 231, 1556-1559.
- Kim, M., Qiao, Z., Yu, J., Montefiori, D., and Reinherz, E.L. (2007). Immunogenicity of recombinant HIV-1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine* 25, 5102-5114.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312, 767-768.
- Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., *et al.* (2002). HIV-1 evades antibody-mediated

- neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-659.
- Li, B., Decker, J.M., Johnson, R.W., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Mulenga, J., Allen, S., Hunter, E., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Blackwell, J.L., and Derdeyn, C.A. (2006). Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C HIV-1. *J. Virol.* 80, 5211-5218.
- Lin, G., Bertolotti-Ciarlet, A., Haggarty, B., Romano, J., Nolan, K.M., Leslie, G.J., Jordan, A.P., Huang, C.C., Kwong, P.D., Doms, R.W., and Hoxie, J.A. (2007). Replication-competent variants of HIV-2 lacking the V3 loop exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *J. Virol.* 81, 9956-9966.
- Liu, S., Lu, H., Niu, J., Xu, Y., Wu, S., and Jiang, S. (2005). Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J. Biol. Chem.* 280, 11259-11273.
- Long, D., Berson, J.F., Cook, D.G., and Doms, R.W. (1994). Characterization of HIV-1 gp120 binding to liposomes containing galactosylceramide. *J. Virol.* 68, 5890-5898.
- Lorizate, M., Cruz, A., Huarte, N., Kunert, R., Perez-Gil, J., and Nieva, J.L. (2006). Recognition and blocking of HIV-1 gp41 pre-transmembrane sequence by monoclonal 4E10 antibody in a Raft-like membrane environment. *J. Biol. Chem.* 281, 39598-39606.
- Louis, J.M., Nesheiwat, I., Chang, L., Clore, G.M., and Bewley, C.A. (2003). Covalent trimers of the internal N-terminal trimeric coiled-coil of gp41 and antibodies directed against them are potent inhibitors of HIV envelope-mediated cell fusion. *J. Biol. Chem.* 278, 20278-20285.
- Lu, M., Blacklow, S.C., and Kim, P.S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1075-1082.
- Luftig, M.A., Mattu, M., Di Giovine, P., Geleziunas, R., Hrin, R., Barbato, G., Bianchi, E., Miller, M.D., Pessi, A., and Carfi, A. (2006). Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 740-747.
- Markosyan, R.M., Leung, M.Y., and Cohen, F.S. (2009). The six-helix bundle of HIVEnv controls pore formation and enlargement and is initiated at residues proximal to the hairpin turn. *J. Virol.* 83, 10048-10057.
- Mascola, J.R. (2002). Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 20, 1922-1925.
- Mascola, J.R., Frankel, S.S., and Broliden, K. (2000). HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. *AIDS* 14 Suppl 3, S167-74.
- Mascola, J.R., and Montefiori, D.C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 413-444.
- McInerney, T.L., Brennan, F.R., Jones, T.D., and Dimmock, N.J. (1999). Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine* 17, 1359-1368.

- McLain, L., Brown, J.L., Cheung, L., Reading, S.A., Parry, C., Jones, T.D., Cleveland, S.M., and Dimmock, N.J. (2001). Different effects of a single amino acid substitution on three adjacent epitopes in the gp41 C-terminal tail of a neutralizing antibody escape mutant of HIV-1. *Arch. Virol.* *146*, 157-166.
- Miller, M.D., Geleziunas, R., Bianchi, E., Lennard, S., Hrin, R., Zhang, H., Lu, M., An, Z., Ingallinella, P., Finotto, M., *et al.* (2005). A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14759-14764.
- Miyauchi, K., Curran, A.R., Long, Y., Kondo, N., Iwamoto, A., Engelman, D.M., and Matsuda, Z. (2010). The membrane-spanning domain of gp41 plays a critical role in intracellular trafficking of the HIV envelope protein. *Retrovirology* *7*, 95.
- Montefiori, D.C., and Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr. Opin. HIV. AIDS.* *4*, 347-351.
- Montero, M., van Houten, N.E., Wang, X., and Scott, J.K. (2008). The membrane-proximal external region of the HIV-1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *72*, 54-84, table of contents.
- Moulard, M., and Decroly, E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim. Biophys. Acta* *1469*, 121-132.
- Muhlbacher, M., Spruth, M., Siegel, F., Zangerle, R., and Dierich, M.P. (1999). Longitudinal study of antibody reactivity against HIV-1 envelope and a peptide representing a conserved site on Gp41 in HIV-1-infected patients. *Immunobiology* *200*, 295-305.
- Munoz-Barroso, I., Durell, S., Sakaguchi, K., Appella, E., and Blumenthal, R. (1998). Dilation of the HIV-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J. Cell Biol.* *140*, 315-323.
- Munoz-Barroso, I., Salzwedel, K., Hunter, E., and Blumenthal, R. (1999). Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* *73*, 6089-6092.
- Myszka, D.G., Sweet, R.W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A., Wyatt, R., Sodroski, J., and Doyle, M.L. (2000). Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 9026-9031.
- Nawaz, F., Cicala, C., Van Ryk, D., Block, K.E., Jelacic, K., McNally, J.P., Ogundare, O., Pascuccio, M., Patel, N., Wei, D., Fauci, A.S., and Arthos, J. (2011). The Genotype of Early-Transmitting HIV gp120s Promotes $\alpha(4)\beta(7)$ -Reactivity, Revealing $\alpha(4)\beta(7)/CD4$ T cells As Key Targets in Mucosal Transmission. *PLoS Pathog.* *7*, e1001301.
- Nehete, P.N., Vela, E.M., Hossain, M.M., Sarkar, A.K., Yahi, N., Fantini, J., and Sastry, K.J. (2002). A post-CD4-binding step involving interaction of the V3 region of viral gp120 with host cell surface glycosphingolipids is common to entry and infection by diverse HIV-1 strains. *Antiviral Res.* *56*, 233-251.
- Nelson, J.D., Brunel, F.M., Jensen, R., Crooks, E.T., Cardoso, R.M., Wang, M., Hessel, A., Wilson, I.A., Binley, J.M., Dawson, P.E., Burton, D.R., and Zwick, M.B. (2007). An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external

- region of HIV-1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *J. Virol.* *81*, 4033-4043.
- Nelson, J.D., Kinkead, H., Brunel, F.M., Leaman, D., Jensen, R., Louis, J.M., Maruyama, T., Bewley, C.A., Bowdish, K., Clore, G.M., *et al.* (2008). Antibody elicited against the gp41 N-heptad repeat (NHR) coiled-coil can neutralize HIV-1 with modest potency but non-neutralizing antibodies also bind to NHR mimetics. *Virology* *377*, 170-183.
- Nguyen, D.G., and Hildreth, J.E. (2003). Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* *33*, 483-493.
- Nyambi, P.N., Mbah, H.A., Burda, S., Williams, C., Gorny, M.K., Nadas, A., and Zolla-Pazner, S. (2000). Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary HIV-1 virions of group M. *J. Virol.* *74*, 7096-7107.
- Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J.R., Wyatt, R., and Kwong, P.D. (2004). Structure and mechanistic analysis of the anti-HIV-1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol.* *78*, 10724-10737.
- Opalka, D., Pessi, A., Bianchi, E., Ciliberto, G., Schleif, W., McElhaugh, M., Danzeisen, R., Gelezianas, R., Miller, M., Eckert, D.M., *et al.* (2004). Analysis of the HIV-1 gp41 specific immune response using a multiplexed antibody detection assay. *J. Immunol. Methods* *287*, 49-65.
- Owens, R.J., Burke, C., and Rose, J.K. (1994). Mutations in the membrane-spanning domain of the HIV envelope glycoprotein that affect fusion activity. *J. Virol.* *68*, 570-574.
- Palker, T.J., Matthews, T.J., Clark, M.E., Cianciolo, G.J., Randall, R.R., Langlois, A.J., White, G.C., Safai, B., Snyderman, R., and Bolognesi, D.P. (1987). A conserved region at the COOH terminus of HIVgp120 envelope protein contains an immunodominant epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 2479-2483.
- Pan, C., Liu, S., and Jiang, S. (2010). HIV-1 gp41 fusion intermediate: a target for HIV therapeutics. *J. Formos. Med. Assoc.* *109*, 94-105.
- Pancera, M. (2005). Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). *Virologie* *9*, 457-472.
- Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y.E., Chen, L., Huang, C.C., Kong, L., Kwon, Y.D., Stuckey, J., Zhou, T., Robinson, J.E., *et al.* (2010). Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1166-1171.
- Parker, C.E., Deterding, L.J., Hager-Braun, C., Binley, J.M., Schulke, N., Katinger, H., Moore, J.P., and Tomer, K.B. (2001). Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of HIV-1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J. Virol.* *75*, 10906-10911.
- Parsons, M.S., Rouleau, D., Routy, J.P., LeBlanc, R., Grant, M.D., and Bernard, N.F. (2011). Selection of human anti-HIV broadly neutralizing antibodies occurs within the context of frozen 1F7-idiotypic repertoire. *AIDS* *25*, 1249-1264
- Phogat, S., and Wyatt, R. (2007). Rational modifications of HIV-1 envelope glycoproteins for immunogen design. *Curr. Pharm. Des.* *13*, 213-227.
- Phogat, S., Wyatt, R.T., and Karlsson Hedestam, G.B. (2007). Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular targets. *J. Intern. Med.* *262*, 26-43.

- Pietzsch, J., Scheid, J.F., Mouquet, H., Klein, F., Seaman, M.S., Jankovic, M., Corti, D., Lanzavecchia, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). Human anti-HIV-neutralizing antibodies frequently target a conserved epitope essential for viral fitness. *J. Exp. Med.* *207*, 1995-2002.
- Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M.I., Goudsmit, J., and Paxton, W.A. (2001). N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J. Biol. Chem.* *276*, 13433-13441.
- Poumbourios, P., McPhee, D.A., and Kemp, B.E. (1992). Antibody epitopes sensitive to the state of HIV-1 gp41 oligomerization map to a putative alpha-helical region. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *8*, 2055-2062.
- Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T.L., Doms, R.W., and Shai, Y. (1999). Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry* *38*, 11359-11371.
- Qiang, W., Sun, Y., and Weliky, D.P. (2009). A strong correlation between fusogenicity and membrane insertion depth of the HIV fusion peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15314-15319.
- Reading, S.A., Heap, C.J., and Dimmock, N.J. (2003). A novel monoclonal antibody specific to the C-terminal tail of the gp41 envelope transmembrane protein of HIV-1 that preferentially neutralizes virus after it has attached to the target cell and inhibits the production of infectious progeny. *Virology* *315*, 362-372.
- Reeves, J.D., Lee, F.H., Miamidian, J.L., Jabara, C.B., Juntilla, M.M., and Doms, R.W. (2005). Enfuvirtide resistance mutations: impact on HIV envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J. Virol.* *79*, 4991-4999.
- Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., and Petropoulos, C.J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing Ab response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4144-4149.
- Robinson, W.E., Jr, Kawamura, T., Gorny, M.K., Lake, D., Xu, J.Y., Matsumoto, Y., Sugano, T., Masuho, Y., Mitchell, W.M., and Hersh, E. (1990). Human monoclonal antibodies to the HIV-1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3185-3189.
- Rosen, O., Chill, J., Sharon, M., Kessler, N., Mester, B., Zolla-Pazner, S., and Anglister, J. (2005). Induced fit in HIV-neutralizing antibody complexes: evidence for alternative conformations of the gp120 V3 loop and the molecular basis for broad neutralization. *Biochemistry* *44*, 7250-7258.
- Roux, K.H., and Taylor, K.A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *17*, 244-252.
- Saifuddin, M., Hart, M.L., Gewurz, H., Zhang, Y., and Spear, G.T. (2000). Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of HIV-1. *J. Gen. Virol.* *81*, 949-955.
- Salzwedel, K., West, J.T., and Hunter, E. (1999). A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the HIV-1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J. Virol.* *73*, 2469-2480.

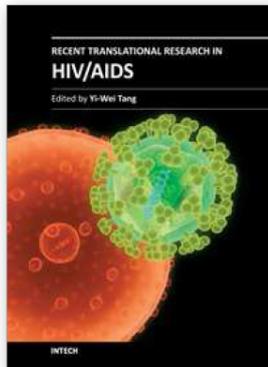
- Sattentau, Q.J., and McMichael, A.J. (2010). New templates for HIV-1 antibody-based vaccine design. *F1000 Biol. Rep.* 2, 60.
- Scanlan, C.N., Pantophlet, R., Wormald, M.R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I.A., Katinger, H., Dwek, R.A., Rudd, P.M., and Burton, D.R. (2002). The broadly neutralizing anti-HIV-1 Ab 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* 76, 7306-7321.
- Scherer, E.M., Zwick, M.B., Teyton, L., and Burton, D.R. (2007). Difficulties in eliciting broadly neutralizing anti-HIV antibodies are not explained by cardiolipin autoreactivity. *AIDS* 21, 2131-2139.
- Schief, W.R., Ban, Y.E., and Stamatatos, L. (2009). Challenges for structure-based HIV vaccine design. *Curr. Opin. HIV. AIDS.* 4, 431-440.
- Selvarajah, S., Puffer, B., Pantophlet, R., Law, M., Doms, R.W., and Burton, D.R. (2005). Comparing antigenicity and immunogenicity of engineered gp120. *J. Virol.* 79, 12148-12163.
- Selvarajah, S., Puffer, B.A., Lee, F.H., Zhu, P., Li, Y., Wyatt, R., Roux, K.H., Doms, R.W., and Burton, D.R. (2008). Focused dampening of Ab response to the immunodominant variable loops by engineered soluble gp140. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 301-314.
- Shang, L., Yue, L., and Hunter, E. (2008). Role of the membrane-spanning domain of HIV-1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J. Virol.* 82, 5417-5428.
- Shnaper, S., Sackett, K., Gallo, S.A., Blumenthal, R., and Shai, Y. (2004). The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively. *J. Biol. Chem.* 279, 18526-18534.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Song, L., Sun, Z.Y., Coleman, K.E., Zwick, M.B., Gach, J.S., Wang, J.H., Reinherz, E.L., Wagner, G., and Kim, M. (2009). Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies disrupt a hinge-related function of gp41 at the membrane interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9057-9062.
- Sougrat, R., Bartesaghi, A., Lifson, J.D., Bennett, A.E., Bess, J.W., Zabransky, D.J., and Subramaniam, S. (2007). Electron tomography of the contact between T cells and SIV/HIV-1: implications for viral entry. *PLoS Pathog.* 3, e63.
- Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D.R., and Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.* 15, 866-870.
- Stanfield, R.L., Gorny, M.K., Williams, C., Zolla-Pazner, S., and Wilson, I.A. (2004). Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal Ab 447-52D. *Structure* 12, 193-204.
- Steckbeck, J.D., Sun, C., Sturgeon, T.J., and Montelaro, R.C. (2010). Topology of the C-terminal tail of HIV-1 gp41: differential exposure of the Kennedy epitope on cell and viral membranes. *PLoS One* 5, e15261.
- Sterjovski, J., Churchill, M.J., Roche, M., Ellett, A., Farrugia, W., Wesselingh, S.L., Cunningham, A.L., Ramsland, P.A., and Gorry, P.R. (2011). CD4-binding site

- alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120-CD4 interactions and fusogenicity. *Virology* 410, 418-428.
- Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F., and Katinger, H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal Ab against a novel epitope on gp41 of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1757-1765.
- Sun, Z.Y., Oh, K.J., Kim, M., Yu, J., Brusica, V., Song, L., Qiao, Z., Wang, J.H., Wagner, G., and Reinherz, E.L. (2008). HIV-1 broadly neutralizing Ab extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane. *Immunity* 28, 52-63.
- Tachibana, M., Siddiqi, M.A., Ikegami, Y., Eshima, K., Shirota-Someya, Y., Tahara-Hanaoka, S., Koito, A., Iizuka, M., and Shinohara, N. (2000). Coreceptor function of mutant human CD4 molecules without affinity to gp120 of human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* 275, 20288-20294.
- Teixeira, C., Gomes, J.R., Gomes, P., and Maurel, F. (2011). Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 979-992.
- Tian, Y., Ramesh, C.V., Ma, X., Naqvi, S., Patel, T., Cenizal, T., Tiscione, M., Diaz, K., Crea, T., Arnold, E., Arnold, G.F., and Taylor, J.W. (2002). Structure-affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal Ab 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J. Pept. Res.* 59, 264-276.
- Trkola, A., Pomales, A.B., Yuan, H., Korber, B., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Katinger, H., Barbas, C.F., 3rd, Burton, D.R., and Ho, D.D. (1995). Cross-clade neutralization of primary isolates of HIV-1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* 69, 6609-6617.
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., and Katinger, H. (1996). Human monoclonal Ab 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of HIV-1. *J. Virol.* 70, 1100-1108.
- Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 3, 975-983.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- van der Goot, F.G., and Harder, T. (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin. Immunol.* 13, 89-97.
- Vanlandschoot, P., Beirnaert, E., Barrere, B., Calder, L., Millar, B., Wharton, S., Jou, W.M., and Fiers, W. (1998). An Ab which binds to the membrane-proximal end of influenza virus haemagglutinin (H3 subtype) inhibits the low-pH-induced conformational change and cell-cell fusion but does not neutralize virus. *J. Gen. Virol.* 79, 1781-1791.

- Veiga, A.S., and Castanho, M.A. (2007). The influence of cholesterol on the interaction of HIV gp41 membrane proximal region-derived peptides with lipid bilayers. *FEBS J.* 274, 5096-5104.
- Veiga, A.S., and Castanho, M.A. (2006). The membranes' role in the HIV-1 neutralizing monoclonal Ab 2F5 mode of action needs re-evaluation. *Antiviral Res.* 71, 69-72.
- Vella, C., Ferguson, M., Dunn, G., Melen, R., Langedijk, H., Evans, D., and Minor, P.D. (1993). Characterization and primary structure of a HIV-1 (HIV-1) neutralization domain as presented by a poliovirus type 1/HIV-1 chimera. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 12), 2603-2607.
- Verkoczy, L., Diaz, M., Holl, T.M., Ouyang, Y.B., Bouton-Verville, H., Alam, S.M., Liao, H.X., Kelsoe, G., and Haynes, B.F. (2010). Autoreactivity in an HIV-1 broadly reactive neutralizing Ab variable region heavy chain induces immunologic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 181-186.
- Veronese, F.D., DeVico, A.L., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Gallo, R.C., and Sarngadharan, M.G. (1985). Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229, 1402-1405.
- Viard, M., Ablan, S.D., Zhou, M., Veenstra, T.D., Freed, E.O., Raviv, Y., and Blumenthal, R. (2008). Photoinduced reactivity of the HIV-1 envelope glycoprotein with a membrane-embedded probe reveals insertion of portions of the HIV-1 Gp41 cytoplasmic tail into the viral membrane. *Biochemistry* 47, 1977-1983.
- Vincent, N., Kone, A., Chanut, B., Lucht, F., Genin, C., and Malvoisin, E. (2008). Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* 22, 2075-2085.
- Vincent, N., Malvoisin, E., Pozzetto, B., Lucht, F., and Genin, C. (2004). Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients. *AIDS* 18, 37-43.
- von Andrian, U.H., and Mackay, C.R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343, 1020-1034.
- Walker, L.M., and Burton, D.R. (2010). Rational Ab-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 358-366.
- Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., Wrinn, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., *et al.* (2009). Broad and potent neutralizing Abs from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326, 285-289.
- Watkins, J.D., Siddappa, N.B., Lakhashe, S.K., Humbert, M., Sholukh, A., Hemashettar, G., Wong, Y.L., Yoon, J.K., Wang, W., Novembre, F.J., *et al.* (2011). An Anti-HIV-1 V3 Loop Ab Fully Protects Cross-Clade and Elicits T-Cell Immunity in Macaques Mucosally Challenged with an R5 Clade C SHIV. *PLoS One* 6, e18207.
- 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., *et al.* (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307-312.
- Weis, W.I., Taylor, M.E., and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 163, 19-34.

- Weiss, R.A. (2003). HIV and AIDS: looking ahead. *Nat. Med.* 9, 887-891.
- Wen, M., Arora, R., Wang, H., Liu, L., Kimata, J.T., and Zhou, P. (2010). GPI-anchored single chain Fv--an effective way to capture transiently-exposed neutralization epitopes on HIV-1 envelope spike. *Retrovirology* 7, 79.
- Wu, X., Yang, Z.Y., Li, Y., Hogerkorp, C.M., Schief, W.R., Seaman, M.S., Zhou, T., Schmidt, S.D., Wu, L., Xu, L., *et al.* (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329, 856-861.
- Wyss, S., Dimitrov, A.S., Baribaud, F., Edwards, T.G., Blumenthal, R., and Hoxie, J.A. (2005). Regulation of HIV-1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* 79, 12231-12241.
- Yang, P., Ai, L.S., Huang, S.C., Li, H.F., Chan, W.E., Chang, C.W., Ko, C.Y., and Chen, S.S. (2010). The cytoplasmic domain of HIV-1 transmembrane protein gp41 harbors lipid raft association determinants. *J. Virol.* 84, 59-75.
- Yu, X., Yuan, X., McLane, M.F., Lee, T.H., and Essex, M. (1993). Mutations in the cytoplasmic domain of HIV-1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* 67, 213-221.
- Yue, L., Shang, L., and Hunter, E. (2009). Truncation of the membrane-spanning domain of HIV-1 envelope glycoprotein defines elements required for fusion, incorporation, and infectivity. *J. Virol.* 83, 11588-11598.
- Zanetti, G., Briggs, J.A., Grunewald, K., Sattentau, Q.J., and Fuller, S.D. (2006). Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog.* 2, e83.
- Zheng, Z., Yang, R., Bodner, M.L., and Weliky, D.P. (2006). Conformational flexibility and strand arrangements of the membrane-associated HIV fusion peptide trimer probed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* 45, 12960-12975.
- Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y.D., Scheid, J.F., Shi, W., Xu, L., *et al.* (2010). Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329, 811-817.
- Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessel, A.J., Van Ryk, D., Xiang, S.H., Yang, X., Zhang, M.Y., Zwick, M.B., Arthos, J., *et al.* (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 445, 732-737.
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr, Chertova, E., Lifson, J.D., Grise, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441, 847-852.
- Zolla-Pazner, S., and Cardozo, T. (2010). Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 527-535.
- Zwick, M.B., and Burton, D.R. (2007). HIV-1 neutralization: mechanisms and relevance to vaccine design. *Curr. HIV. Res.* 5, 608-624.
- Zwick, M.B., Jensen, R., Church, S., Wang, M., Stiegler, G., Kunert, R., Katinger, H., and Burton, D.R. (2005). Anti-HIV-1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J. Virol.* 79, 1252-1261.

- Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R., and Parren, P.W. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of HIV-1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* 75, 10892-10905.
- Zwick, M.B., Parren, P.W., Saphire, E.O., Church, S., Wang, M., Scott, J.K., Dawson, P.E., Wilson, I.A., and Burton, D.R. (2003). Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of HIV-1 gp120. *J. Virol.* 77, 5863-5876.



Recent Translational Research in HIV/AIDS

Edited by Prof. Yi-Wei Tang

ISBN 978-953-307-719-2

Hard cover, 564 pages

Publisher InTech

Published online 02, November, 2011

Published in print edition November, 2011

The collective efforts of HIV/AIDS research scientists from over 16 countries in the world are included in the book. This 27-chapter Open Access book well covers HIV/AIDS translational researches on pathogenesis, diagnosis, treatment, prevention, and also those beyond conventional fields. These are by no means inclusive, but they do offer a good foundation for the development of clinical patient care. The translational model forms the basis for progressing HIV/AIDS clinical research. When linked to the care of the patients, translational researches should result in a direct benefit for HIV/AIDS patients.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Fahd Benjelloun, Christian Genin and Stephane Paul (2011). HIV-1 Glycoprotein Immunogenicity, Recent Translational Research in HIV/AIDS, Prof. Yi-Wei Tang (Ed.), ISBN: 978-953-307-719-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-translational-research-in-hiv-aids/hiv-1-glycoprotein-immunogenicity>

INTECH
open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821

Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Structure in the Induction of Broadly Neutralizing Antibodies

F. Benjelloun,^a P. Lawrence,^c B. Verrier,^b C. Genin,^a and S. Paul^a

GIMAP EA3064, CIC CIE3 Vaccinology, Faculté de Médecine de Saint Etienne, Université de Lyon, Lyon, France^a; Institut de Biologie et Chimie des Protéines, FRE 3310 CNRS/UCBL, Lyon, France^b; and Laboratory of Human Virology, INSERM U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France^c

Very soon after the discovery of neutralizing antibodies (NAbs) toward human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, it became apparent that characterization of these NAbs would be an important step in finding a cure for or a vaccine to eradicate HIV-1. Since the initial description of broadly cross-clade NAbs naturally produced in HIV-1 patients, numerous studies have described new viral targets for these antibodies. More recently, studies concerning new groups of patients able to control their viremia, such as long-term nonprogressors (LTNPs) or elite controllers, have described the generation of numerous envelope-targeted NAbs. Recent studies have marked a new stage in research on NAbs with the description of antibodies obtained from a worldwide screening of HIV-positive patients. These studies have permitted the discovery of NAb families with great potential for both neutralization and neutralization breadth, such as PG, PGT, CH, and highly active agonistic anti-CD4 binding site antibodies (HAADs), of which VRC01 and its variants are members. These antibodies are able to neutralize more than 80% of circulating strains without any autoreactivity and can be rapidly integrated into clinical trials in order to test their protective potential. In this review, we will focus on new insights into HIV-1 envelope structure and their implications for the generation of potent NAbs.

The isolation of new human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope-specific neutralizing antibodies (NAbs) has been a high priority since they were identified as potential targets for vaccine design. Until recently, only a few recombinant NAbs were available for clinical trials. The use of new technologies using single-cell sorting of antigen-specific memory B cells together with PCR amplification of immunoglobulin genes has allowed the production of new antibodies, such as VRC01 (Table 1). Furthermore, high-neutralization screening of short-term memory B cell cultures has yielded PG9 and PG16 monoclonal antibodies (MAbs), which are broadly cross-reactive, and has defined a new target on the gp120 envelope glycoprotein (81, 146). In naturally infected HIV-1 patients, broadly neutralizing Abs (bNAbs) are not commonly produced. Antibodies that are produced are often directed against strain-specific or nonneutralizing determinant sites. Only 10 to 25% of HIV-1-infected individuals generate neutralizing antibody, and a minority of these individuals are able to neutralize several strains with considerable breadth. The development of a highly effective HIV-1 vaccine will likely depend on success in designing immunogens that elicit bNAbs toward naturally circulating strains of HIV-1 (66, 125, 127, 147). Until the last few years, only four NAbs had been defined, but recently, more than a dozen MAbs displaying substantial breadth have been isolated. An understanding of their recognition sites, the structural basis of their interaction with the HIV envelope, and their development pathways provides new opportunities to design vaccine candidates that will elicit bNAbs against this virus. For the majority of licensed vaccines, NAbs have been demonstrated to be one of the best correlates of vaccine efficacy. Their neutralizing activities could be therefore attributed to their capacity to either bind tightly to functional envelope glycoproteins, and thereby block viral entry into the host cells, or initiate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (ADCVI). These mechanisms are mediated via the Fc regions of clustered immunoglobulin G1 (IgG1) or IgG3

recognized by Fc receptors on cells of the innate immune system, leading to the phagocytosis of infected cells upon opsonization, and activation of the classical complement pathway (32, 56). In this review, we will describe the latest insights into the characterization of envelope function during HIV-1 infection. We will then discuss the generation and characterization of new potent broadly cross-clade NAbs.

HIV-1 ENVELOPE GLYCOPROTEIN

The envelope glycoprotein of HIV-1 gp160 (Env) is synthesized in the rough endoplasmic reticulum and subjected to extensive N glycosylation, resulting in high-mannose chains linked to Asn residues at either the Asn-X-Ser or the Asn-X-Thr glycosylation site. gp160 matures by enzymatic cleavage through the host protease furin before anchoring at the membrane surface, in two subunits associated by noncovalent interactions: the surface gp120 (SU) and the transmembrane (TM) gp41 (45, 153). Both gp120 and gp41 are involved in the interaction, recognition, and promotion of the fusion of viral and cellular membranes and are the determinants of viral tropism (16). The Env spikes are thought to be trimeric, and structure-based models forming heterotrimeric complexes have been proposed using tomography by cryo-electron microscopy (9, 119). The envelope proteins are the most immunogenic compounds of HIV-1 particles because they are the only viral protein expressed on the viral membrane. These Env spikes of HIV-1, in their native configuration, elicit partially effective humoral immune responses (107, 149) and represent obvious vaccine targets.

Published ahead of print 26 September 2012

Address correspondence to S. Paul, stephane.paul@chu-st-etienne.fr.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.01110-12

TABLE 1 HIV-1 Env-specific NAb's

Monoclonal antibodies	IsoType	Epitope on:	Epitope core	Epitope type	Clade neutralization	Polypreactivity	Reference(s)
ZF5	IgG1	gpM1	MPER 663-683, ⁶⁵⁹ ELDKRWV ⁶⁸⁸	Linear	III _B , MN, RP, SF2	Cardiolipin, phospholipid, the centromere B autotigen	47, 106, 127
4E10	IgG1	gpM1	MPER 671-676, ⁶⁷¹ NWVFD/NIT ⁶⁷⁶	Linear (discontinuous)	A (D1259, 92RW02/6, 92RW009), C (94ZM106, D128, DU151)	B (JR-F1, HxB-2), E (CM235, 97TH101), F (BZ162, RI), G (G3, R0570)	47, 161
Z13e1 HS20	Fab IgG	gpM1 gpM1 HR1	MPER 671-676, ⁶⁷¹ NWVFDIT ⁶⁷⁶ ⁵⁴ QSHLLQLTVWGIKQL ⁷⁵	Linear (conformational) Linear (conformational)	B (JR-F1), C (94ZM109), E (CM235) A 92RW009, B SF1262, C 92BR025	BC CH1102, CRF01_VI1888, CRF02_VI1090	161 1, 20, 113
PG39 PG16	IgG	gp120 trimer	V2 and V3 loop	Conformational	A 94UG103, 92RW020 B JRCSF, APV-17, APV-6	C93N905, IAVI C22, IAVI C18, IAVI C3, D 92UG024, CRF01_AE CM2U02	146
VR001	IgG	gp120	CD4 binding site	Conformational	100% clade A, 96% clade B, 87% clade C, 88% clade D	89% CRF01_AE, 81% CRF02_AG, 99% clade G, 100% CRF07_BC	Not available 27, 151
RI2 2G12	IgG1 IgG1	gp120 gp120	CD4 binding site Carbohydrate moieties in C2, C3, and V4	Discontinuous Discontinuous	B primary/JR-F1, JR-CSF, III _B A/B	100% CRF07_BC	Not available 162 57
PGT	IgG	gp120	Mannose glycans on gp120	Conformational/gp120 trimer	~70% of globally circulating HIV strains, especially PG1128	76% clade D, 93% clade F, 87% of (100% clade A, 90% clade A/E, 100% clade A/G, 94% clade B, 79% clade C)	Not available 100, 145
VRCPG04	IgG	gp120 SRC	CD4 binding site	Conformational	88% of 162-pseudovirus panel	76% clade D, 93% clade F, 87% of (100% clade A, 90% clade A/E, 100% clade A/G, 94% clade B, 79% clade C)	Not available 31, 151, 157
CH01-04	IgG	gp120	V2/V3	Conformational	36% (CH02), 47% (CH04) of 91 tier-2 pseudoviruses	80% clade C)	6, 7
HI16	IgG	gp120	CD4bs V3, C1, C2	Conformational	Preferentially neutralized tier-2 isolates A, 92RW009, C isolate VR29	D C13, CRF02_AG V11090, and CA18, subtype B, subtype AD	Not available 1, 20
HGN194	IgG	gp120	V3 loop RRSVRIGPQTF	Conformational	All tier-1 viruses from clades A, B, and C, 11% of tier-2 viruses	C9B B1, 26, SF162, and SS1196, I 3M V965, 26, 96ZM651, 2 and 92BR025, 9	Not available 1, 20

gp120 ENVELOPE GLYCOPROTEIN

gp120 represents the external part of the envelope glycoprotein and is involved in the early steps of viral infection of target cells. It consists of conserved (C) and variable (V) protein domains which, when folded, comprise an inner domain, an outer domain, and a bridging sheet (110). One of the viral defense mechanisms evolved against antibody neutralization is the masking of key regions on SU with glycans. In this respect, 20 to 24 N-glycosylation sites are present on gp120. The V1/V2 and V3 variable regions are extended-loop structures which comprise a significant portion of the gp120 surface features. Hypervariable regions/domains that form exposed "loops" anchored at their bases by disulfide bonds (132) are located near the surface of the molecule. The V1/V2 loop is subdivided into V1 and V2 by a disulfide bridge and is involved in modulating viral tropism and resistance to neutralization (81, 98, 115). V1/V2 stabilizes proximal gp120-gp120 and/or gp120-gp41 associations either directly or indirectly through stiffening of V1/V2-associated elements (55). V1/V2 consists of 50 to 90 residues that contain two of the most variable portions of the virus, and about 1 in 10 residues are N-glycosylated (111). The gp120 subunit contains functional sites, such as the CD4 binding site (CD4bs). CD4bs consists of a conserved pocket-like structure between the three gp120 units flanked by variable loops and the chemokine coreceptor binding site for CXCR4 and/or CCR5 that is exposed and/or formed after virus attachment to cells. The internal domain is near the point of contact with gp41 and the N and C termini of gp120. Numerous broadly neutralizing human antibodies have been identified that target epitopes on V1/V2 loops or quaternary neutralizing epitopes (QNEs) formed by the interaction of V2 and V3 and expressed on native Env trimers but not soluble Env (37), including PG9 and PG16, which neutralize 70 to 80% of circulating HIV-1 isolates, Abs CH01 to CH04, which neutralize 40 to 50% of isolates, and PGT141 to -145, which neutralize 40 to 80% of strains (6, 145, 146). Most of the QNE-specific Abs show sensitivity for an N-linked glycan at position 160 in V2 (HXB2 numbering) and show preferential binding to the assembled viral spike structure over monomeric gp120 as well as sensitivity to changes in V1/V2 and some V3 residues (65, 146). These quaternary-structure-preferring V1/V2-directed Abs are among the most common broadly neutralizing responses in infected donors (86). Among them we find PG9 and PG16 (which neutralize 70 to 80% of circulating HIV-1 isolates), CH01 to CH04 (which neutralize 40 to 50% of isolates), and PGT141 to -145 (which neutralize 40 to 80%) (6, 145, 146). The third variable loop (V3) of HIV-1 gp120 is comprised of 35 amino acids (aa), which are arranged in a disulfide loop involving two cysteines and play an important role in coreceptor selection (CCR5 or CXCR4), and is a target site for NAbs (105, 157). Indeed, removal of a single N-linked glycosylation site in the V3 loop (position 301) increases the sensitivity of primary isolates to neutralization. Thus, sugars that flank receptor-binding regions on gp120 protect primary HIV-1 isolates from antibody-mediated neutralization (64). N-linked residues are less present in gp120 regions that require structural plasticity and refolding during the infection process, although glycans can also reside on structurally mobile and/or flexible elements, such as the V4 and V5 loops of the outer domain (e.g., from extended loop to a β -strand or α -helix). The hypervariable V4 loop is highly heterogeneous due to several insertions and deletions and, as a consequence, the increase of potential N-gly-

cosylation sites (PNG) (2, 41). In contrast, V5 is less glycosylated than V4 (21) and plays a role in CD4 binding and neutralizing antibody responses (51, 71), as shown with VRC01 (2, 41). These host-derived carbohydrates protect the protein surface underlying the gp120 by masking them. The sugar microheterogeneities thereby form a perfect immunological shield that leads to a decrease in the immune response directed against viral particles (19, 97, 116).

gp120 IMMUNOGENICITY

During HIV-1 infection, gp120-specific Abs are naturally generated against conserved sites on the envelope that are crucial to host receptor recognition or viral fusion (159). Immunological and three-dimensional structural studies of Env have shown that these regions were highly flexible during interaction with other surface molecules, thus explaining how Abs specific for some variable regions have neutralizing activity against diverse viruses. However, induction of NAbs by using rationally designed immunogens has, so far, proven unsuccessful (68, 73, 114, 121, 122, 151, 159). Indeed, gp120-specific Abs typically recognize neutralizing epitopes located on variable loops (23, 86) or dominant nonneutralizing conserved epitopes on Env (36, 96). This provides a rational basis for understanding the immunological cross-reactivity of many MAbs targeting the V1/V2 and V3 variable loops of gp120 and the quaternary neutralization epitopes (QNEs) formed by V2 and V3. The V3 loop and the "bridging sheet" contain the binding site for the viral coreceptor (CCR5 or CXCR4) (4, 46, 67, 106). The glycan-rich outer face of gp120 is also the target of the broadly neutralizing MAb (bnMAb) 2G12 (14, 57, 116, 136) (Table 1). In fact, 2G12 together with b12 were the first well-described broadly active NAbs against gp120 (Table 1). 2G12 shows an unusual interlocked VH domain-swapped dimer generating an extended and monovalent binding surface and recognizes clustered $\alpha 1 \rightarrow 2$ -linked mannose residues on the distal ends of oligomannose sugars located on the carbohydrate-covered silent face of the gp120 outer domain. 2G12 displays a unique reversible kinetic mechanism of neutralization and inhibits interactions between the V3 loop and the tyrosine sulfate-containing CCR5 amino terminus, and thereby viral entry, by disturbing the formation of fusion complexes (102). The capacity of monomeric or dimeric 2G12 to mediate ADCC or to activate the complement system has been clearly demonstrated *in vitro* (62, 137). B12 was derived from a phage library in which heavy and light chains were randomly reassorted. B12 recognizes an epitope that overlaps the binding site of gp120 to the CD4 receptor and efficiently neutralizes many strains of HIV-1. B12 can also protect macaques from vaginal challenge with simian-human immunodeficiency virus (SHIV) (13, 162).

Numerous Abs, including NAbs 17b, X5, m18, and m14, have been described for their capacity to bind to the CD4-induced site. All of these contain long H3s regions that play a major role in their mechanism of binding. The H3s regions of X5, m6, and m9 appear to be very flexible and highly potent at neutralizing HIV (88, 105, 150, 158). Recent works from Corti et al. have described new and potent bNAbs HGN194 and HJ16, directed against gp120 (20) (Table 1). HJ16 was obtained from a donor infected with a clade C virus. This antibody binds to CD4bs, thus preventing interaction of HIV-1 with CD4. HJ16 recognizes a discontinuous epitope on a surface proximal to the CD4bs on gp120. This epitope is completely distinct and nonoverlapping with that recognized by

CD4bs-specific antibody b12. HJ16 exhibits a broad neutralizing activity comparable in breadth to that of b12. HJ16 and b12 present complementarity in their neutralizing properties toward a group of viruses, referred to as tier-2 isolates, which have moderate sensitivity to antibody-mediated neutralization (20, 120). HGN194 was isolated from memory B cells of a long-term non-progressor (LTNP) infected with an HIV-1 clade AG circulating recombinant form (CRF). This Ab recognizes a conformational epitope in the V3 loop and neutralizes all tier-1 viruses (those with a low sensitivity to antibody-mediated neutralization) across clades but only 11% of tier-2 viruses tested by Wu et al. (148). *In vivo*, administration of the IgG1 HGN194 in rhesus monkeys significantly decreases virus titers after HIV-1 challenge and seems to drastically affect viral reservoirs (148) (Table 1).

Numerous broadly gp120-specific NAbs were discovered using a multistep strategy (146). A new approach of NAb screening from a clade A-infected patient has been described; this approach combines binding of Abs to recombinant gp120 and gp41 with a high-throughput microneutralization assay, resulting in the improvement of the quality of selected candidates. B cells from infected donors obtained in the selection step were isolated (146). Pools of the VH- or VL-region clones were subcloned into a human IgG1 constant domain context. The first described potent bNAbs were PG9 and PG16. They are somatically related and appear to be derived from the same recombination of heavy and light chains. These antibodies have been identified by a large screening of 1,800 serum samples from HIV-positive donors. PG9 and PG16 both target discontinuous epitopes involving the conserved regions of V1, V2, and V3 loops and overlapping the CD4bs present in the assembled viral spike. They are sensitive to a loss of the N332 glycan and a N160/K168 substitution in the V2 loop or an isoleucine at position 215 in the C2 region (133) but are clearly distinct from 2G12 (97, 146). Despite the vaunted diversity of the HIV-1 gp120 envelope and the high sequence variability in the V2 and V3 regions (146), neutralization assays indicate that the recognized epitope is conserved in 70 to 80% of circulating viral isolates. Recently, McLellan et al. (80) solved the atomic structure of PG9, in complex with V1/V2, which allowed the identification of conserved features that enable recognition of gp120 (80). PG9 overcomes variability of the V1/V2 protein sequence by binding to the atomic backbone of the protein rather than to the variable amino acid side chains. Associated with the strong evolutionary conservation of N332 glycans in gp120, PG9 is able to recognize 80% of HIV-1 circulating strains. Interaction between PG9 and V1/V2 occurs mainly with N-linked glycan as PG9 binding the glycan at position 160 on gp120. The third complementarity-determining region (CDR) of the heavy chain (CDRH3) reaches through the glycan shield to contact the protein-proximal *N*-acetylglucosamine area. In addition to glycan recognition, a strand in the CDRH3 of PG9 forms intermolecular parallel β -sheet-like hydrogen bonds to V1/V2 strand C. Strand C is the most variable V1/V2 strand, and this sequence-independent means of recognition probably allows for an increased breadth of recognition (81). The net charge in β -strand C influences the interaction with PG9 and PG16. The length and number of glycosylation sites in V2 confer resistance to PG9 and PG16 by creating a hindrance in antibody binding or hiding crucial residues of PG9 and PG16 epitopes (108). The CDRH3 of PG9 comprises a hammerhead that occupies a slot between two glycans on gp120, contacting the flanking glycan surfaces and binding to the protein surface at its base (115).

Cryo-electron microscopy results concerning the binding of PG9 with glycan 160 (Man5GlcNAc2) suggest this glycan to be of an appropriate size such that it does not clash with the antibody light chain and does not stretch between the tip and base of the PG9 CDRH3 (81). Thus, PG9 is an example of the immune system actually exploiting the viral glycan defenses by binding directly to them. The changes in the heavy and light chains that allow for glycan recognition occur during affinity maturation and provide a possible explanation for the observed increase in PG9 (and PG16) breadth and affinity. The overall neutralization sensitivity is the consequence of characteristic molecular features of the V2 loop, and neutralization by PG9/16 is balanced by the glycans, the net positive charge and, possibly, the length of the V2 loop. Neutralization by PG9 correlates strongly with that by PG16, indicating that these Abs recognize a common HIV-1 epitope. This suggests that a common surface of the paratope on PG9 and PG16 might be involved in HIV-1 recognition. Substantial differences in sequence are found between PG9 and PG16 (28, 97). An analysis of the antibody variable genes revealed two pairs of somatic variants, each one containing a long heavy-chain complementarity determining region 3 (CDRH3). Long CDRH3 loops have been previously associated with polyreactivity of MAbs, such as 2F5, 4E10, or 1b12, which also bind different autoantigens, such as phospholipids (cardiolipin, phosphatidylserin) or histone antigen (50, 141) (Table 1).

Other very recent studies have given rise to a number of Abs with different properties of potency and breadth of neutralization (100, 145, 146). A new family of NAbs was isolated by screening antibody-containing memory B cell supernatants for broad neutralizing activity from the top four elite neutralizers from approximately 1,800 HIV-infected donors. The eliciting is based on a score incorporating both breadth and potency. Antibody variable genes were rescued from B cell clones showing cross-clade neutralizing activity and expressing full-length IgGs. It was revealed that all of the monoclonal Abs isolated from each individual donor belong to a distant, but clonally related, cluster of Abs. Two of six bNAbs (PGT125 to -128 and -130 to -131) that bind specifically to the Man8/9 glycans on gp120 have also been described recently and are potently neutralizing across clades (100, 145) (Table 1). A model of the Fab PGT128 complex with a fully glycosylated gp120 outer domain reveals that the antibody penetrates the glycan shield and recognizes two conserved glycans N332 and N301 as well as a short β -strand segment of the gp120 V3 loop (100). It was also observed that their neutralization of HIV may be mediated by cross-linking Env trimers on the viral surface. PGT128, the broadest of these Abs, neutralizes over 70% of globally circulating viruses and is, on average, an order of magnitude more potent than the recently described PG9, PG16, VRC01, and VRCPG04 bnMAbs and two orders of magnitude more potent than the prototype bnMAbs described earlier (4, 146, 151, 152). PGT Abs neutralize the cell surface trimer with more potency than their Fab and also exhibit the interesting property of being able to reduce the half-life of the virus, while 2G12 had no effect on the half-life of the virus. By electronic microscopy, it has been demonstrated that PGT127 and -128 are able to cross-link with the spikes on the surfaces of virus particles, thereby increasing their affinity through avidity effects, but not on the surfaces of envelope-expressing cells (100). These Abs target a sensitive conserved and highly exposed epitope, including two glycans (N301/N332), and V3 loop backbone components that make this region an at-

tractive immunogen for vaccine design (145). In the same family of bNAbs, PGT141 to -145 present a strong preference for quaternary epitopes similar to those described for PG9 and PG16. These Abs neutralize around 40 to 80% of circulating HIV-1 isolates and present the same properties of CDRH3 as PG9 or PG16, with an extended CDRH3 loop and a β -hairpin tip able to penetrate the N-linked glycan barrier and reach the protein surface beneath.

The inefficiency in isolating broadly reactive CD4bs-directed NABs from human B cells is probably due to the use of immunogens that are reactive with many HIV-1-specific antibodies, including nonneutralizing antibodies. Recent observations on envelope structure have been combined with computer-assisted protein design to define recombinant forms of HIV-1 Env that specifically interact with NABs directed against the CD4 binding site (70, 71, 151, 156). A resurfaced stabilized core (RSC) HIV-1 gp120 molecule, mimicking the site of initial CD4 receptor binding, has allowed the isolation of the CD4bs-specific MAb VRC with extensive neutralization breadth. To isolate these MABs, antigen-specific memory B cell sorting was used, together with single-cell PCR, to amplify IgG H- and L-chain genes from individual B cell cDNA (117). Memory B cells able to bind to the RSC were selected. The matched H- and L-chain genes were amplified and cloned into IgG1 expression vectors that reconstitute the constant regions allowing the expression of full IgG. Three Abs (VRC01, VRC02, and VRC03) were elicited by this strategy. Comparisons of the nucleotide sequence of heavy and light chains revealed that VRC01 and VRC02 are somatic variants of the same IgG1 clone. The heavy-chain CDR3 of the two MABs was composed of the same 14 aa, while the heavy chain CDR3 of VRC03 contained 16 aa. Both MABs are highly somatically mutated, with 32% of the heavy chain variable gene (VH) and 17 to 19% of the kappa light chain variable gene (VK) nucleotides divergent from putative germ line gene sequences. VRC03 was potentially derived from a different IgG1 clone, but its heavy chain was derived from the same alleles as VRC01 and VRC02. VRC03 also presents a hyper-somatic mutation with an unusual amino acid insertion in heavy-chain framework 3 and with 30% of VH and 20% of VK nucleotides derived from putative germ line gene sequences. Overall, the three MABs share common sequence motifs in heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3. A cryo-electron microscopic analysis of binding characteristics revealed that VRC01 and VRC02 act as partial CD4 agonists in their binding with gp120 and partially mimic the interaction of CD4 with gp120 (135). This characteristic may explain their breadth, as interaction with CD4 is crucial for infection. In these studies, it was observed that among circulating HIV-1 isolates tested for sensitivity to VRC01, 173 of 190 were neutralized and only 17 of 190 were resistant. Data for VRC02 are very similar. VRC03 is less broad than VRC01 and VRC02, neutralizing only 57% of viruses (151). A structural analysis of these resistant isolates showed important variations in the V5 region (Table 1). However, the low VRC01 resistance frequency suggests that VRC01 uses a recognition mechanism that allows binding despite V5 variations. Studying the interaction of VRC01 with V5 shows that VRC01 recognition of the V5 domain in gp120 is different than that seen with CD4. The V5 loop fits into the gap between heavy and light chains. A model of the interaction between VRC01 and the Env functional trimer has recently been proposed. In this model, VRC01 locks the Env functional trimer in a low-energy conformation and disables further rearrangements that occur during virus entry (71). Thus, interaction with the

more conserved residues at the loop base is sufficient for VRC01 activity independently of variation in the top of the V5 loop (156). Finally, the observation that VRC01 does not display substantial self-reactive or polyreactive properties could facilitate the use of passive-protection studies in nonhuman primates and then in humans.

Recently, deep-sequencing technology combined with bioinformatics has been used for the first time to identify bNAb sequences from millions of variable heavy-chain sequences in HIV-infected individuals (27, 152). This deep screening has allowed the isolation of many antibodies, referred to as VRC and VRC-like antibodies, including the bNAb VRCPG04 isolated from one donor (with a virus subtyped as clade A1/D) and VRC-CH31 from another donor. Those Abs are similar to VRC01 in their breadth and potency. They also bind to the CD4Bs, are highly affinity matured, and are derived from the IgVH1-2 germ line gene. PGV04 was sorted from single memory B cells of an elite neutralizer by using the RSC3 protein and a CD4bs-defective version for selective isolation of potent CD4bs MABs (152). VRC-PG04 has a neutralizing profile distinct from those of CD4, b12, and VRC01. In the first neutralizing assays against a multiclade 162-pseudovirus panel, PGV04 neutralized 88% of the pseudoviruses, while PG9 neutralized only 75% (31). Therefore, VRC-PG04 exhibited enhanced breadth compared to PG9 with a similar potency. In a second neutralization assay with a 97-pseudovirus panel, PG9, PGV04, and VRC01 neutralized 82%, 87%, and 93% of viruses, respectively. Therefore, VRC01 and PGV04 have nearly the same breadth and the same profile of neutralization. In addition, VRC-PG04 showed no evidence of polyreactivity (31). Several alanine substitutions affect CD4bs MAB neutralization and binding differently; D279A substitution decreases neutralization by VRC01 and CD4-IgG but does not affect neutralization by b12, while the I420A and I423A substitutions decrease VRC01 neutralization but increase both CD4-IgG and b12 neutralization. However, each of these three substitutions (D279A, I420A, and I423A) abrogates PGV04 neutralization. The highly conserved nature of the residues that are important for VRC-PG04 recognition likely explains how PGV04 is able to achieve broad neutralization.

In contrast to VRC01, VRC-PG04 did not enhance 17b or X5 binding to its epitope (the CD4-induced [CD4i] site) in the coreceptor region on the gp120 monomer (31). VRC-PG04 displayed both a heavy-chain variable gene (VH) mutation frequency and a level of affinity maturation similar to those observed with VRC01-03. The VRC-PG04 Fab was crystallized in complex with a gp120 core from the recombinant clade A/E 93TH057 that was previously crystallized with VRC01 (156). The crystallized complex showed strong similarity with the one obtained with VRC01, despite different donor origins and only 50% amino acid identity in the HC variable region. An overlay of the heavy chains of VPG04 and VRC01 revealed small differences, but critical interactions in the Asp³⁶⁸ gp120 salt bridge to Arg⁷¹ VRC01 were maintained in VRC-PG04. The remarkable convergence in recognition observed with VRC01, VRC03, and VRC-PG04 suggests a similar mechanism of HIV-1 gp120 recognition, conserved between infected donors. The precision required for this mode of recognition likely arises as a consequence of the multiple mechanisms of immune evasion that protect the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120 (19). Thus, precise H-binding is required for the convergence in structure that enhances regions with hydrophobic interactions and focuses precisely on the initial site of CD4 receptor attach-

ment (152, 156, 157). Surprisingly, this convergence in epitope recognition is not matched in antibody sequence identity. Indeed, 10 antibodies that bind RSC3 use the IGHV1-2*02 germ line and accrue 70 to 90 nucleotide changes. Even if these mature Abs share the same epitope recognition, only two residues from the germ line IGHV1-2*02 allele mature to give the same amino acids (152). Both of these changes occur at a hydrophobic contact in the critical region 2 (CDRH2). Despite this divergence in maturation, a comparison of the VRC01, VRC03, and VRC-PG04 paratopes shows that many of these changes are of a conserved chemical character. Overall, these observations suggest that affinity maturation does converge with epitope recognition even if there is divergence in specific residue maturation and that VRC-PG04, VRC01, b12, and CD4-IgG recognize the CD4bs in somewhat different ways.

Isolation of single memory B cells from the blood of HIV-infected individuals using parts of the HIV Env protein has been also described recently (117, 118). Variable regions of the light and heavy chains of the antibody genes expressed by B memory cells were amplified by a new strategy of PCR and then used to produce new MABs (118). Different primers were designed to amplify even highly mutated antibody genes from B cells by binding to less-mutated parts of the antibody sequences (117). As is the case for other recently described HIV-specific bNABs, the most potent new bNABs identified show an unusually high degree of somatic hypermutation (152). Regarding their capacity to efficiently neutralize HIV-1 strains, several antibodies were selected, including the VRC01 variant NIH45-46 and 3BNC60. These Abs showed binding patterns similar to that of VRC01 on gp120. New classes of highly active agonistic anti-CD4 binding site antibodies (HAADs) that expose the coreceptor binding site on gp120 and mimic binding of the host receptor CD4 have also been described (118). This antibody class shares IgVH and IgVL consensus sequences, including the contact residues between VRC01 and the HIV spike. In five different donors, these antibodies originate from only two closely related IgVH genes and three IgVL genes. The variable portions of the heavy chain of the most potent new bNABs and VRC01 have about 68% of their amino acid sequence in common and also share a origin in that they are derived from two related germ line genes, IgVH1-2 and IgVH1-46. In addition, the crystal structure of the Fab region of one of the new bNABs, 3BNC60, was similar to VRC01, suggesting that it binds gp120 in a similar way and by mimicking CD4 binding and disrupting the envelope trimers. More recently, the structure of the most potent clonal variant of VRC01, NIH45-46, has been described in more detail (27). This antibody resembles VRC01 but includes a four-residue insertion (residues 99a to 99d) within CDRH3, a property acquired by somatic hypermutation. Three of these residues are important in the binding to gp120 and neutralization activities. In comparison with VRC01 neutralization data, NIH45-46 was more potent than VRC01 on 62 of the viruses tested from a panel of 82 tier-2 and -3 viruses representing all known clades but still less potent than 3BNC117 (118, 151). In the same study (27), the ability of VCR03 to bind gp120 and to increase neutralizing activity by modifying the contact zones with gp120 was attempted by constructing a new variant of NIH45-46 by tryptophan substitution. The mutant obtained showed enhanced potency of neutralization since it neutralizes six NIH45-46-resistant strains, making this antibody, NIH45-46^{G54W}, one of the rare MABs that could be a candidate in the design of a new vaccine.

In order to elicit NABs from the sera of an African donor infected with a clade A strain of HIV-1 (125), Bonsignori et al. used a combination of different methods of memory B cell isolation, clonal or oligoclonal culture systems, single-cell flow sorting, Epstein-Barr virus (EBV) transformation, and recombinant antibody cells (6). A family of Abs from the same clonal lineage of bNABs was identified, such as quaternary bNABs (CH01 to CH04), CD4 binding site (VRC01-like) bNABs (CH30, CH31, and CH32), V3 NAB (CH19), and a novel gp41 NAB against the 3-glycan gp41 site. CH11.CH01 to -04 antibodies recognize a conformational epitope on the V2/V3 region. Similarly to MABs PG9 and PG16, CH01 to CH04 recognize an epitope on a single protomer that is usually, but not exclusively, conferred to the gp120 envelope glycoprotein by trimer formation (6, 22, 144). MABs CH01 to CH04 bind a PG9/PG16-like conformational epitope but present differences in their breadths of neutralization and residue sensitivities compared to those of PG9/PG16. They neutralize 36% (CH02) to 47% (CH04) of 91 tier-2 pseudoviruses. However, when CH01 and VRC-CH31 are combined, they neutralized 86 of 91 of HIV-1 strains (95%) (7). The CH01 to -04 antibodies share similar V(D)J rearrangements, the same length of CDRH3, and high degrees of similarity to CDRH3 and CDRL3, thus indicating that they belong to the same clonal family. Somatic mutations of the VDJ nucleotide sequences of CH01 to CH04 (11.5 to 14.3%) are similar to those of MABs PG9 (11.9%) and PG16 (13.2%). In the same way as for anti-gp41 MPER NABs, MAB CH03 is autoreactive for ribonucleoprotein, centromere B, and histone antigens, and MABs CH01 to CH03 are polyreactive with the hepatitis C virus E2 protein or gut flora antigens. This autoreactivity could potentially and indeed does probably induce tolerance mechanisms, such as anergy or deletion (50, 141). Like PG9/PG16, CH01/CH04 NABs present a long region 3 (HCDR3). This suggests a common mechanism of generation or selection of Abs with a long CDHR3.

Recently, the human mAb2909, isolated by immortalization of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from asymptomatic and drug-naïve HIV-1 patients (38), has been shown to bind to a quaternary structure on virions expressing only V2, V3, and the CD4 binding site but not to soluble monomeric gp120 (17, 37). This antibody demonstrates a high neutralizing activity for primary isolates such as SF162. Its neutralizing activity against SF162 is 750- to 100,000-fold more potent than those of other well-characterized NABs. HIV-1 SF162 contains a rare polymorphism consisting of a single-amino-acid substitution in the V2 domain (K¹⁶⁰ nonpermissive for N glycosylation). This substitution leads to the loss of the conserved N-linked glycosylation site that is essential for the epitope of PG9 and PG16 (146). The occurrence of MAB 2909 suggests the possible existence of additional oligomer-specific Abs that may possess broader neutralizing activity.

gp41 ENVELOPE GLYCOPROTEIN

The binding of gp120 to CD4 and the viral coreceptors results in conformational changes and triggers the establishment of a "fusion complex" composed of gp41 trimers (29, 91, 113). gp41 is the transmembrane (TM) domain for the entire envelope glycoprotein and thus anchors the viral spikes in the bilayer lipid membrane of viral particles and, as stated above, plays an important role in membrane fusion and cell entry. It presents an extracellular domain, a TM domain, and an intracytoplasmic domain. gp41 sequences are more conserved than those of gp120 and contain

only four N-glycosylation sites on their ectodomain. These glycosylation sites are highly conserved and appear to contribute to optimal viral replication efficiency (58). The N-terminal hydrophobic region consists of the fusion peptide (aa 512 to 527), a polar region (PR, aa 525 to 543) that is also called the fusion peptide proximal region (FPPR), the N-terminal heptad repeat (NHR or HR1) (546 to 581), and the C-terminal heptad repeat (CHR or HR2). These regions are folded as α -helices and linked by a loop, generally referred to as the immunodominant loop (598 to 604), containing a disulfide bridge. A highly conserved tryptophan-rich membrane-proximal ectodomain/external region (MPER; 660 to 683) is also present (15). Finally, the membrane-spanning domain or transmembrane (MSD/TM) and the intracytoplasmic tail or C-tail are two other hydrophobic regions present at the C-terminal portion. A complete structural description of whole-molecule gp41 is not yet clearly defined. A crystallized intact trimer is currently unavailable, because it seems that large portions appear to be in constant motion, probably as part of the conformational masking defense of potential epitopes from NAbs (30, 80).

gp41 IMMUNOGENICITY

gp41 is largely occluded by quaternary interactions within native Env (18, 126, 153, 155, 158). During the fusion process, conformational changes occurring after interaction with gp120 expose different gp41 regions accessible for NAbs. Some of these exposed regions are essential for the infection process, and blocking them can inhibit infection and neutralize the virus (Table 1). The NAbs 2F5, Z13e1, and 4E10 can specifically bind Env and block a late stage of the fusion process (26, 92, 93, 130, 160). Despite great efforts, high NAb titers against any of the conserved sites on Env have not yet been elicited (61, 68, 101). Recently, the HK20 gp41-specific antibody was obtained from immortalized memory B cells from an HIV-1-infected individual (20) (Table 1). This Ab targets the conserved hydrophobic pocket in HR1. The crystal structure of HR1-specific human MAb HK20 in complex with the 5-helix domain of gp41 shows that HK20 binds to the same region as that recognized by D5, a human antibody directed against the N-heptad region (83) but differs significantly from D5 in terms of contact sites and shows a role for somatic mutations in affinity maturation (77). These aspects influence the potency and breadth of neutralization, which are higher for HK20 than for D5 and depend on somatically mutated residues. In addition, it was shown that in the case of HK20, the scFv is at least 15-fold more potent in neutralization than IgG, which is consistent with a limited accessibility to the target site (112). The gp41 footprints of HK20 and D5 and the global structural principles employed by the two antibodies are similar. Since HK20 targets HR1 instead of MPER or glycans in this region, it has the conceptual advantage over 4E10 and 2F5 of avoiding potential autoreactivity (112). HK20 presents an intermediate breadth of neutralization, preferentially to clades A and C, which did not correspond with the subtype of the infected patient, which was CRF02_AG as described in reference 1. Cross-reactive antibodies to the NHR have also been detected in HIV-1-positive sera, indicating its immunogenic potential (104). Moreover, the NHR trimer-specific D5 NAb was generated from a native single-chain variable fragment library. In the same way as the T-20 peptide, D5 inhibits the assembly of the fusion intermediate *in vitro* (83). D5 was derived from B cells of HIV-naïve subjects and has not been subject to extensive somatic hypermuta-

tion, with only seven non-complementarity-determining region amino acid changes from germ line sequences. Unlike b12, 2F5, and 4E10, D5 IgG does not have an atypically long heavy chain CDR3. Unlike 2G12, D5 does not require a "domain-swapped" structure for neutralization activity. D5 retains antiviral activity against primary HIV isolates when converted to an IgG1 format. Finally, and most importantly, D5 was elected by binding to IZN36 and 5H, which are synthetic antigens with well-defined structures mimicking the 6-helix bundle structure. In addition, new NAbs, such as 8K8 and DN9, with limited potency against the NHR trimer of HIV-1, have been isolated by screening of a phage display library (94). Antigen binding and monoclonal Ab competition experiments using 8K8, DN9, and D5 strongly suggest that the epitopes of 8K8 and DN9 are closely related but differ from the D5 epitope. D5 preferentially binds to NHR mimetics in the absence of CHR peptide, thus indicating a significant cross-reactivity of D5 with immobilized 6-helix (77, 83). Similarly, C34 HR2 peptide competes efficiently with 8K8 and DN9 binding to immobilized NHR mimetics (e.g., 5-helix and IZN36), but not with D5. The 3764 Fab has also been shown to bind to the NHR region with the same efficiency for the free mimetics of the NHR coiled-coil-like N35CCG-N13 (94) and for the interaction with CHR peptide in the form of a 6-helix bundle (42, 43).

As described above, gp41 comprises several functional regions which play a major role in fusion of the virus and host cell membranes. These regions are not static during the infection process but retain a degree of flexibility. For instance, HR regions form a six-helix coiled-coil bundle playing an important role in both the early and late stages of the membrane fusion process (16, 58, 74, 76, 90) including the formation of the fusion pore (90, 123, 124). The Fab 3674 is directed against the helix bundle and neutralizes diverse laboratory adapted B strains of HIV-1 and primary isolates of subtypes A, B, and C (43). This structure was described for other NAbs and shows neutralizing activity against primary isolates (142). MPER contains the epitopes of three well-known bNAbs, 2F5, 4E10, and Z13 (12, 161). Recently, MPER-specific antibodies were characterized for an individual chronically infected with subtype C (CAP206). These antibodies present a great breadth of neutralization and were targeted to the distal MPER centered on the D674 asparagine residue (40). Isolation of a novel MPER-specific NAb (CAP206-CH12) from the same individual has also been achieved through the amplification of Ig gene fragments from single memory B cells (87). This MAb overlapped the 4E10 and Z13e1 epitopes and neutralized the same subset of viruses sensitive to the plasma antibodies. CAP206-CH12 used the same VH and VK Ig gene families as the 4E10 NAb, and its CDRH3 sequence showed strong similarities with that of Z13e1 as a result of shared J gene usage. CAP206-CH12 presents a low neutralization activity and limited potency, similar to Z13e1, and reacted with viruses of subtypes C and B. While the CAP206-CH12 MAb was polyreactive, unlike 2F5 and 4E10, it did not bind lipids with high avidity. These data suggest the possibility of convergent evolution among HIV-1 gp41 MPER MAbs. CAP206-CH12 utilized VH1-69 and VK3-20 in a manner similar to that seen with gp41 antibody 4E10. Other gp41 antibodies, such as D5 and HK20 that bind to the stalk of gp41, also utilize VH1-69. VH1-69-derived antibodies are hydrophobic and seem to show a preference for regions of virus envelopes that are in close proximity to viral membranes. CAP206-CH12 shares the same YYYMD motif in its CDRH3 as Z13e1 and has a shorter CDRH3 that presents some

flexible residues adjacent to the Tyr motif but lacks the hydrophobic residue W or F present in 4E10 and the Z13e1 CDRH3 apex crucial for neutralization (11, 60). MPER-specific Abs present in naturally infected patients are not as broadly neutralizing as 2F5 or 4E10 (8, 15, 89).

Recent studies using chimeric pseudoviruses presenting epitopes in a context more closely related to the MPER structure suggest that MPER-specific NABs are relatively rare or absent during natural infection. However, the fact that new NABs map to a different region in MPER than 2F5 and 4E10 provides hope by suggesting that NABs may be vaccine induced (49, 69). In animal models, 2F5 has been shown to interrupt HIV-1 mucosal transmission and confers protection against SHIV infection (79). The 2F5 antibody was isolated from human immortalized B cells and recognizes an epitope lying between glutamic acid 662 and alanine 667 (ELDKWA). Studies have shown, with an expression library and protection against protease experiments, that this epitope is in fact wider (EQELLELDKWASLWN). By addition of a leucine at each side (LELDKWASL), the affinity of 2F5 for its epitope is increased more than 2,000 times (82, 95, 100, 134). In models studying the involvement of the viral membrane using POPC (1-oleyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) and POPC/cholesterol in the recognition and binding to its epitope, it has been shown that 2F5 does not interact with the membrane before fixation (139). In the absence of a hydrophobic environment, 2F5 and 4E10 are unable to bind to the MPER region (95). Recently, it was shown that the binding of 2F5 causes peptide docking on the membrane and increases the ability of the MAb to be intrusive (33). 2F5 induces a confined local disorder in the membrane which can promote exposure and interaction with gp41. The 2F5 epitope contains a β -turn conformation and immunogen which when presented in a membrane context may better mimic the epitope and consequently improve the binding of this Ab (134). Moreover, the polyspecificity of 2F5 and 4E10 and autoreactivity by binding to cardiolipin could explain the low activity of these antibodies *in vivo* since the immune system depletes all B cells which produce autoreactive Abs (47) or induce tolerance mechanisms (140), even if occasionally, some autoreactivity can be related to the development of HIV bNABs at the cellular level and at the level of serum antibodies, as is the case for 9G4 bNABs that present self-reactivity to systemic lupus erythematosus (SLE) and neutralizing properties (63).

The 4E10 NAB is also a promising MPER-specific Ab that has been isolated from B cells of HIV patients. It binds a deeper epitope than the 2F5 epitope in the MPER and presents neutralizing activities against primary isolates and laboratory strains of HIV-1. 4E10 binds to a highly conserved linear epitope on MPER⁶⁷¹NWF(D/N)IT⁶⁷⁶ (161). Crystallographic structures of the epitope have been characterized and form a large helical shape with the important residues on the same side of the helix (44). The antigen reacts only with residues of the base and center of the loop of CDRH3. However, much of this loop is not involved in binding to the antigen. The top of the loop of CDRH3 of 4E10 forms a flat hydrophobic surface which suggests a possible interaction with the membrane of the virus. Structural models predict formation of the epitope of 2F5 and 4E10 to be highly dependent on the presence of membrane, since affinity of 4E10 increases in the presence of lipids (75). The W⁶⁷², F⁶⁷³, and T⁶⁷⁶ residues seem to be crucial for 4E10 binding since their replacement with alanine residues drastically reduces affinity (10). The ⁶⁷¹NWFDITNWLWYI

K⁶⁸³ sequence is optimal for 4E10 recognition. In resistant strains, the pattern NWF(N/D)IT indicates that the 4E10 epitope is complex and would even be discontinuous (44). Mass spectrometry studies reveal that 4E10 binds to the N terminus of gp120 and gp41 on the native conformation (130). It has been suggested that the pattern NWF(N/D)IT forms a cryptic epitope accessible only during the intermediate stages of the merger/fusion. It seems that 4E10 has a higher affinity for the membrane than 2F5, thus conferring the capacity to promote peptide extraction from the bilayer lipid membrane (33). The 4E10 Ab also has a polyspecificity for autoantigens, such as histone or double-stranded DNA (dsDNA). The Z13 Fab is also a derived MPER-specific Ab. This Ab, derived from an expression library, recognizes an epitope located on the C terminus of the 2F5 epitope, which overlaps the 4E10 epitope. The epitope of Z13 is centered on the sequence ⁶⁷¹NWF DIT⁶⁷⁶, but this sequence is dependent on the conformation of the motif and changes such as N glycosylation of asparagine 674 (D⁶⁷⁴) or exposure to a native protein. This Ab is able to weakly neutralize several clades, such as B, C, and D (161).

In several *in vivo* pharmacokinetic studies and phase I/II clinical trials, intravenous high doses of the three neutralizing antibodies, 4E10, 2F5, and 2G12, were given in combination to 14 HIV-1-infected individuals at weekly intervals over 3 months. The results showed that these three Abs are able to maintain an undetectable viral load in patients in whom infection had been suppressed by antiviral therapy (59). These studies also showed that 4E10 administration is not highly immunogenic, with rare IgM raised against 4E10 but no IgG. Clearance and half-life of 4E10 are identical to those of other classical therapeutic Abs.

CONCLUSIONS

Passive administration of rare human Env-specific monoclonal bNABs to rhesus macaques can protect them against SHIV challenge (52–54, 78, 80, 84). Detection of high gp120-specific NAB titers was correlated to protection in 31% of vaccinated humans in the recent RV144 Thai trial (48, 109). Furthermore, clues gleaned from the breakthroughs from the protocol G and the very recent Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI) studies have confirmed that a major goal of HIV-1 vaccine development is to design highly immunogenic Env antigens capable of inducing NABs (24, 80, 127). Data from human clinical trials demonstrate that the first generation of soluble protein and vectored Env immunogens are safe and immunogenic. However, the Abs generated are only effective on highly sensitive strains. From the recent literature on HAADs and/or PG NABs, and their cross-reactivity among circulating viruses, gp120 seems to be an important target immunogen even if the coverage of neutralization is not complete and despite the fact that the glycan shield could evolve and mask potential epitopes. Using gp41 as a target for a prophylactic vaccine can be another important alternative. However, targeted gp41 epitopes are accessible during a short time window occurring while the conformational changes triggered by the fusion process are ongoing. The recently described HK20 epitope may be considered a serious candidate for an anti-HIV vaccine approach. Indeed, conserved Env epitopes targeted by NABs are poorly immunogenic because they either are masked by the glycan shield (3, 149), appear transiently (34), are sterically hindered (67, 119), or must overcome entropy for Ab binding. Another important point is that conserved epitopes (particularly in gp41) present homologies with self-proteins that could trigger tolerance mechanisms

(47, 50, 141). Finally, even when Abs can neutralize infecting strains, their effect is transient due to escape mutations (107, 149). To date, immunization of nonhuman primates and humans with HIV-1 Env monomers or trimers has failed to induce bNABs. Induced Abs are mainly effective on easily neutralized tier-1 strains but have weak neutralization abilities for tier-2 and tier-3 strains (35, 80). Poor cross-reactivity of vaccine-elicited NABs appears to be related to the restricted repertoire of induced Abs and to the complexity of the native viral spike structure. Strikingly, most of the NABs described in the literature are IgG. The study of neutralizing responses in the mucosal compartment is crucial for the challenge to design a new vaccine. Several studies have described the potential role of mucosal secretory IgA to locally block infection. The involvement of anti-Env secretory IgA that blocks both transcytosis and infection has been well described (5, 25, 138). Secretory IgA from parotid saliva or milk that was also described to recognize different epitopes on gp160, such as V1V2 and/or gp41, could also have neutralization cross-reactive properties (39, 143). However, the role of IgA remains controversial, and seric IgA seems to be also associated with a loss of response in the Thai trial.

The role of NABs in the containment of viral replication in infected individuals seems to be uncertain, and in most cases, NABs do not protect against disease progression (1). However, NABs may neutralize the virus during the first step of infection and may help in the induction of adaptive immunity against HIV to prevent or delay the progression to AIDS. Detection of NABs depends on the *in vitro* neutralization assays used, and standardization of the assays is essential in order to be able to compare the magnitudes and qualities of NAB responses from sera or other fluids from HIV-infected patients, uninfected HIV-1 exposed persons, and vaccinated humans. Viral mechanisms to prevent neutralization include high variability and extensive glycosylation of the envelope proteins, envelope trimerization and shedding, as well as late exposure of functionally important entry domains by conformational changes induced upon CD4 binding. These are also the difficulties encountered in the design of immunogens able to induce NABs upon vaccination. Finally, solutions to improve access of neutralizing molecules, such as antibody heavy chain or Fab, to crucial residues or key regions can be found by looking at what occurs in animal models. Recently, camelid Abs, which consist of a unique heavy chain and have some properties superior to those of classical antibodies, have been described. Llama heavy chain antibody fragment (VHH) that neutralizes and recognizes epitopes on CD4bs has been characterized (131). The VHH antibodies are small enough to interfere during formation of the viral synapsis and thus inhibit the crucial early steps of infection. Other animals producing Abs with the same properties, such as sharks and cartilaginous fishes (131, 132), could provide new insights into anti-HIV vaccine development.

The development of an HIV vaccine has proven to be a formidable scientific challenge given the extreme genetic variability of the virus, lack of good animal models, lack of knowledge of all of the mechanisms involved in immunity, and certain limitations in current technology. However, existing and recent data would appear to suggest that the ability of a candidate vaccine to generate a bNAB response against multiple epitopes in the Env glycoprotein will be of high importance. Faced with a very accomplished escape mechanism with the sole aim of thwarting and circumventing the entire spectrum of immune strategies employed by our immune

system, we must distinguish between immunogenicity and antigenicity and every aspect of the immune response. Recent advances in the development of new immunogens or new bNABs in combination with the deepening of our knowledge of the structure of the envelope glycoprotein and its interaction with neutralizing antibodies can show the way for the development and design of a new and effective vaccine able to prevent or contain HIV infection and/or progression to AIDS.

REFERENCES

1. Balla-Jhaghhoorsingh SS, et al. 2011. Characterization of neutralizing profiles in HIV-1 infected patients from whom the HJ16, HGN194 and HK20 mAbs were obtained. *PLoS One* 6:e25488. doi:10.1371/journal.pone.0025488.
2. Belair M, et al. 2009. The polymorphic nature of HIV type 1 env V4 affects the patterns of potential N-glycosylation sites in proviral DNA at the intrahost level. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25:199–206.
3. Binley JM, et al. 2010. Role of complex carbohydrates in human immunodeficiency virus type 1 infection and resistance to antibody neutralization. *J. Virol.* 84:5637–5655.
4. Binley JM, et al. 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* 78:13232–13252.
5. Bomsel M, et al. 2011. Immunization with HIV-1 gp41 subunit viro-somes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 34:269–280.
6. Bonsignori M, et al. 2011. Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors. *J. Virol.* 85:9998–10009.
7. Bonsignori M, et al. 2012. Two distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a single HIV-1-infected donor: implications for vaccine design. *J. Virol.* 86:4688–4692.
8. Braibant M, et al. 2006. Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS* 20:1923–1930.
9. Briggs JA, et al. 2009. Structure and assembly of immature HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:11090–11095.
10. Brunel FM, et al. 2006. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J. Virol.* 80:1680–1687.
11. Bryson S, Julien JP, Hynes RC, Pai EF. 2009. Crystallographic definition of the epitope promiscuity of the broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5: vaccine design implications. *J. Virol.* 83:11862–11875.
12. Buchacher A, et al. 1994. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10:359–369.
13. Burton DR, et al. 2011. Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:11181–11186.
14. Calarese DA, et al. 2003. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300:2065–2071.
15. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263–273.
16. Chan DC, Kim PS. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93:681–684.
17. Changela A, et al. 2011. Crystal structure of human antibody 2909 reveals conserved features of quaternary structure-specific antibodies that potently neutralize HIV-1. *J. Virol.* 85:2524–2535.
18. Chen B, et al. 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433:834–841.
19. Chen L, et al. 2009. Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* 326:1123–1127.
20. Corti D, et al. 2010. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 5:e8805. doi:10.1371/journal.pone.0008805.
21. Curlin ME, et al. 2010. HIV-1 envelope subregion length variation

- during disease progression. *PLoS Pathog.* 6:e1001228. doi:10.1371/journal.ppat.1001228.
22. Davenport TM, et al. 2011. Binding interactions between soluble HIV envelope glycoproteins and quaternary-structure-specific monoclonal antibodies PG9 and PG16. *J. Virol.* 85:7095–7107.
 23. Davis KL, et al. 2009. High titer HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination. *Virology* 387:414–426.
 24. de Souza MS, et al. 2012. The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. *J. Immunol.* 188:5166–5176.
 25. Devito C, et al. 2002. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 30:413–420.
 26. Dimitrov AS, et al. 2007. Exposure of the membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Biochemistry* 46:1398–1401.
 27. Diskin R, et al. 2011. Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design. *Science* 334:1289–1293.
 28. Doria-Rose NA, et al. 2010. Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J. Virol.* 84:1631–1636.
 29. Dwyer JJ, et al. 2003. The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N-terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for six-helix bundle formation. *Biochemistry* 42:4945–4953.
 30. Eckert DM, Kim PS. 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70:777–810.
 31. Falkowska E, et al. 2012. PG V04, an HIV-1 gp120 CD4 binding site antibody, is broad and potent in neutralization but does not induce conformational changes characteristic of CD4. *J. Virol.* 86:4394–4403.
 32. Forthal DN, Moog C. 2009. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr. Opin. HIV AIDS* 4:388–393.
 33. Franquelim HG, et al. 2011. Anti-HIV-1 antibodies 2F5 and 4E10 interact differently with lipids to bind their epitopes. *AIDS* 25:419–428.
 34. Frey G, et al. 2008. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:3739–3744.
 35. Gilbert P, et al. 2010. Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. *J. Infect. Dis.* 202:595–605.
 36. Gnann JW, Jr, Nelson JA, Oldstone MB. 1987. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 61:2639–2641.
 37. Gorny MK, et al. 2005. Identification of a new quaternary neutralizing epitope on human immunodeficiency virus type 1 virus particles. *J. Virol.* 79:5232–5237.
 38. Gorny MK, et al. 1991. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:3238–3242.
 39. Granados-González V, et al. 2009. Role of the HIV-1 gp120 V1/V2 domains in the induction of neutralizing antibodies. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27:523–530. (In Spanish.)
 40. Gray ES, et al. 2009. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J. Virol.* 83:11265–11274.
 41. Guglietta S, Pantaleo G, Graziosi C. 2010. Long sequence duplications, repeats, and palindromes in HIV-1 gp120: length variation in V4 as the product of misalignment mechanism. *Virology* 399:167–175.
 42. Gustchina E, et al. 2010. Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS Pathog.* 6:e1001182. doi:10.1371/journal.ppat.1001182.
 43. Gustchina E, Louis JM, Lam SN, Bewley CA, Clore GM. 2007. A monoclonal Fab derived from a human nonimmune phage library reveals a new epitope on gp41 and neutralizes diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* 81:12946–12953.
 44. Hager-Braun C, Tomer KB. 2005. Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry. *Expert Rev. Proteomics* 2:745–756.
 45. Hallenberger S, et al. 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360:358–361.
 46. Hartley O, Klasse PJ, Sattentau QJ, Moore JP. 2005. V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21:171–189.
 47. Haynes BF, et al. 2005. Cardioliolin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308:1906–1908.
 48. Haynes BF, et al. 2012. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.* 366:1275–1286.
 49. Haynes BF, Montefiori DC. 2006. Aiming to induce broadly reactive neutralizing antibody responses with HIV-1 vaccine candidates. *Expert Rev. Vaccines* 5:579–595.
 50. Haynes BF, Moody MA, Verkoczy L, Kelsoe G, Alam SM. 2005. Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis. *Hum. Antibodies* 14:59–67.
 51. Hemming A, et al. 1994. Identification of three N-linked glycans in the V4-V5 region of HIV-1 gp120, dispensable for CD4-binding and fusion activity of gp120. *Arch. Virol.* 134:335–344.
 52. Hessel AJ, et al. 2007. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 449:101–104.
 53. Hessel AJ, et al. 2009. Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat. Med.* 15:951–954.
 54. Hessel AJ, et al. 2009. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog.* 5:e1000433. doi:10.1371/journal.ppat.1000433.
 55. Hu G, Liu J, Taylor KA, Roux KH. 2011. Structural comparison of HIV-1 envelope spikes with and without the V1/V2 loop. *J. Virol.* 85:2741–2750.
 56. Huber M, Trkola A. 2007. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J. Intern. Med.* 262:5–25.
 57. Huskens D, Van Laethem K, Vermeire K, Balzarini J, Schols D. 2007. Resistance of HIV-1 to the broadly HIV-1-neutralizing, anti-carbohydrate antibody 2G12. *Virology* 360:294–304.
 58. Johnson WE, Sauvron JM, Desrosiers RC. 2001. Conserved, N-linked carbohydrates of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are largely dispensable for viral replication. *J. Virol.* 75:11426–11436.
 59. Joos B, et al. 2006. Long-term multiple-dose pharmacokinetics of human monoclonal antibodies (MAbs) against human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1773–1779.
 60. Julien JP, Bryson S, Nieva JL, Pai EF. 2008. Structural details of HIV-1 recognition by the broadly neutralizing monoclonal antibody 2F5: epitope conformation, antigen-recognition loop mobility, and anion-binding site. *J. Mol. Biol.* 384:377–392.
 61. Kim M, Qiao Z, Yu J, Montefiori D, Reinherz EL. 2007. Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine* 25:5102–5114.
 62. Klein JS, Webster A, Gnanapragasam PN, Galimidi RP, Bjorkman PJ. 2010. A dimeric form of the HIV-1 antibody 2G12 elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *AIDS* 24:1633–1640.
 63. Kobie JJ, et al. 2012. 9G4 autoreactivity is increased in HIV-infected patients and correlates with HIV broadly neutralizing serum activity. *PLoS One* 7:e35356. doi:10.1371/journal.pone.0035356.
 64. Koch M, et al. 2003. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* 313:387–400.
 65. Krachmarov C, et al. 2011. Characterization of structural features and diversity of variable-region determinants of related quaternary epitopes recognized by human and rhesus macaque monoclonal antibodies possessing unusually potent neutralizing activities. *J. Virol.* 85:10730–10740.
 66. Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. 2011. Rational design of vaccines to elicit broadly neutralizing antibodies to HIV-1. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 1:a007278. doi:10.1101/cshperspect.a007278.
 67. Labrijn AF, et al. 2003. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 77:10557–10565.
 68. Law M, Cardoso RM, Wilson IA, Burton DR. 2007. Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J. Virol.* 81:4272–4285.
 69. Li B, et al. 2006. Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 80:5211–5218.

70. Li Y, et al. 2007. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat. Med.* 13:1032–1034.
71. Li Y, et al. 2011. Mechanism of neutralization by the broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibody VRC01. *J. Virol.* 85:8954–8967.
72. Reference deleted.
73. Li Y, et al. 2009. Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 83:1045–1059.
74. Liu S, et al. 2005. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J. Biol. Chem.* 280:11259–11273.
75. Lorizate M, et al. 2006. Recognition and blocking of HIV-1 gp41 pre-transmembrane sequence by monoclonal 4E10 antibody in a Raft-like membrane environment. *J. Biol. Chem.* 281:39598–39606.
76. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* 2:1075–1082.
77. Luftig MA, et al. 2006. Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:740–747.
78. Mascola JR. 2002. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 20:1922–1925.
79. Mascola JR, Frankel SS, Brolden K. 2000. HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. *AIDS* 14(Suppl. 3):S167–S174.
80. Mascola JR, Montefiori DC. 2010. The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 28:413–444.
81. McLellan JS, et al. 2011. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 480:336–343.
82. Menendez A, Chow KC, Pan OC, Scott JK. 2004. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J. Mol. Biol.* 338:311–327.
83. Miller MD, et al. 2005. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:14759–14764.
84. Montefiori DC, Mascola JR. 2009. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr. Opin. HIV AIDS* 4:347–351.
85. Moore PL, et al. 2011. Potent and broad neutralization of HIV-1 subtype C by plasma antibodies targeting a quaternary epitope including residues in the V2 loop. *J. Virol.* 85:3128–3141.
86. Moore PL, et al. 2009. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog.* 5:e1000598. doi:10.1371/journal.ppat.1000598.
87. Morris L, et al. 2011. Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting. *PLoS One* 6:e23532. doi:10.1371/journal.pone.0023532.
88. Moulard M, et al. 2002. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:6913–6918.
89. Mühlbacher M, Spruth M, Siegel F, Zangerle R, Dierich MP. 1999. Longitudinal study of antibody reactivity against HIV-1 envelope and a peptide representing a conserved site on Gp41 in HIV-1-infected patients. *Immunobiology* 200:295–305.
90. Muñoz-Barroso I, Durell S, Sakaguchi K, Appella E, Blumenthal R. 1998. Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J. Cell Biol.* 140:315–323.
91. Muñoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E, Blumenthal R. 1999. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* 73:6089–6092.
92. Muster T, et al. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67:6642–6647.
93. Nelson JD, et al. 2007. An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *J. Virol.* 81:4033–4043.
94. Nelson JD, et al. 2008. Antibody elicited against the gp41 N-heptad repeat (NHR) coiled-coil can neutralize HIV-1 with modest potency but non-neutralizing antibodies also bind to NHR mimetics. *Virology* 377:170–183.
95. Ofek G, et al. 2004. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol.* 78:10724–10737.
96. Palker TJ, et al. 1987. A conserved region at the COOH terminus of human immunodeficiency virus gp120 envelope protein contains an immunodominant epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:2479–2483.
97. Pancera M, et al. 2010. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:1166–1171.
98. Pantophlet R, Burton DR. 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 24:739–769.
99. Parker CE, et al. 2001. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J. Virol.* 75:10906–10911.
100. Pejchal R, et al. 2011. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science* 334:1097–1103.
101. Phogat S, Wyatt R. 2007. Rational modifications of HIV-1 envelope glycoproteins for immunogen design. *Curr. Pharm. Des.* 13:213–227.
102. Platt EJ, Gomes MM, Kabat D. 2012. Kinetic mechanism for HIV-1 neutralization by antibody 2G12 entails reversible glycan binding that slows cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:7829–7834.
103. Pollakis G, et al. 2001. N-linked glycosylation of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J. Biol. Chem.* 276:13433–13441.
104. Pombourios P, McPhee DA, Kemp BE. 1992. Antibody epitopes sensitive to the state of human immunodeficiency virus type 1 gp41 oligomerization map to a putative alpha-helical region. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8:2055–2062.
105. Prabhakaran P, et al. 2006. Structural mimicry of CD4 by a cross-reactive HIV-1 neutralizing antibody with CDR-H2 and H3 containing unique motifs. *J. Mol. Biol.* 357:82–99.
106. Reeves JD, et al. 2005. Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J. Virol.* 79:4991–4999.
107. 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.
108. Ringe R, Phogat S, Bhattacharya J. 2012. Subtle alteration of residues including N-linked glycans in V2 loop modulate HIV-1 neutralization by PG9 and PG16 monoclonal antibodies. *Virology* 426:34–41.
109. Rolland M, Gilbert P. 2012. Evaluating immune correlates in HIV type 1 vaccine efficacy trials: what RV144 may provide. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28:400–404.
110. Roux KH, Taylor KA. 2007. AIDS virus envelope spike structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:244–252.
111. Rusert P, et al. 2011. Interaction of the gp120 V1V2 loop with a neighboring gp120 unit shields the HIV envelope trimer against cross-neutralizing antibodies. *J. Exp. Med.* 208:1419–1433.
112. Sabin C, et al. 2010. Crystal structure and size-dependent neutralization properties of HK20, a human monoclonal antibody binding to the highly conserved heptad repeat 1 of gp41. *PLoS Pathog.* 6:e1001195. doi:10.1371/journal.ppat.1001195.
113. Salzwedel K, West JT, Hunter E. 1999. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J. Virol.* 73:2469–2480.
114. Sapphire EO, et al. 2007. Structure of a high-affinity “mimotope” peptide bound to HIV-1-neutralizing antibody b12 explains its inability to elicit gp120 cross-reactive antibodies. *J. Mol. Biol.* 369:696–709.
115. Sattentau QJ. 2011. Vaccinology: a sweet cleft in HIV’s armour. *Nature* 480:324–325.
116. Scanlan CN, et al. 2002. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1→2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* 76:7306–7321.
117. Scheid JF, et al. 2009. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458:636–640.
118. Scheid JF, et al. 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333:1633–1637.
119. Schief WR, Ban YE, Stamatatos L. 2009. Challenges for structure-based HIV vaccine design. *Curr. Opin. HIV AIDS* 4:431–440.
120. Seaman MS, et al. 2010. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 84:1439–1452.

121. Selvarajah S, et al. 2005. Comparing antigenicity and immunogenicity of engineered gp120. *J. Virol.* 79:12148–12163.
122. Selvarajah S, et al. 2008. Focused dampening of antibody response to the immunodominant variable loops by engineered soluble gp140. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24:301–314.
123. Shnaper S, Sackett K, Gallo SA, Blumenthal R, Shai Y. 2004. The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively. *J. Biol. Chem.* 279:18526–18534.
124. Shu W, et al. 2000. Helical interactions in the HIV-1 gp41 core reveal structural basis for the inhibitory activity of gp41 peptides. *Biochemistry* 39:1634–1642.
125. Simek MD, 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. *J. Virol.* 83:7337–7348.
126. Sougrat R, et al. 2007. Electron tomography of the contact between T cells and HIV-1: implications for viral entry. *PLoS Pathog.* 3:e63. doi:10.1371/journal.ppat.0030063.
127. 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.
128. Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF, Wilson IA. 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science* 305:1770–1773.
129. Stanfield RL, Dooley H, Verdino P, Flajnik MF, Wilson IA. 2007. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *J. Mol. Biol.* 367:358–372.
130. Stiegler G, et al. 2001. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17:1757–1765.
131. Strokappe N, et al. 2012. Llama antibody fragments recognizing various epitopes of the CD4bs neutralize a broad range of HIV-1 subtypes A, B and C. *PLoS One* 7:e33298. doi:10.1371/journal.pone.0033298.
132. Teixeira C, Gomes JR, Gomes P, Maurel F. 2011. Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug. *Eur. J. Med. Chem.* 46:979–992.
133. Thenin S, et al. 2012. Naturally occurring substitutions of conserved residues in human immunodeficiency virus type 1 variants of different clades are involved in PG9 and PG16 resistance to neutralization. *J. Gen. Virol.* 93(Pt 7):1495–1505.
134. Tian Y, et al. 2002. Structure-affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J. Pept. Res.* 59:264–276.
135. Tran EE, et al. 2012. Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation. *PLoS Pathog.* 8:e1002797. doi:10.1371/journal.ppat.1002797.
136. Trkola A, et al. 1995. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J. Virol.* 69:6609–6617.
137. Trkola A, et al. 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70:1100–1108.
138. Tudor D, et al. 2009. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol.* 2:412–426.
139. Veiga AS, Castanho MA. 2006. The membranes' role in the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5 mode of action needs re-evaluation. *Antiviral Res.* 71:69–72.
140. Verkoczy L, et al. 2011. Rescue of HIV-1 broad neutralizing antibody-expressing B cells in 2F5 VH x VL knockin mice reveals multiple tolerance controls. *J. Immunol.* 187:3785–3797.
141. Verkoczy L, et al. 2010. Autoreactivity in an HIV-1 broadly reactive neutralizing antibody variable region heavy chain induces immunologic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:181–186.
142. Vincent N, et al. 2008. Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* 22:2075–2085.
143. Vincent N, Malvoisin E, Pozzetto B, Lucht F, Genin C. 2004. Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients. *AIDS* 18:37–43.
144. Volpe JM, Cowell LG, Kepler TB. 2006. SoDA: implementation of a 3D alignment algorithm for inference of antigen receptor recombinations. *Bioinformatics* 22:438–444.
145. Walker LM, et al. 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477:466–470.
146. Walker LM, et al. 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326:285–289.
147. Walker LM, et al. 2010. A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog.* 6:e1001028.
148. Watkins JD, et al. 2011. An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. *PLoS One* 6:e18207.
149. Wei X, et al. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307–312.
150. Wen M, et al. 2010. GPI-anchored single chain Fv—an effective way to capture transiently-exposed neutralization epitopes on HIV-1 envelope spike. *Retrovirology* 7:79.
151. Wu X, et al. 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329:856–861.
152. Wu X, et al. 2011. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333:1593–1602.
153. Wyatt R, Sodroski J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884–1888.
154. Yang P, et al. 2010. The cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 harbors lipid raft association determinants. *J. Virol.* 84:59–75.
155. Zanetti G, Briggs JA, Grunewald K, Sattentau QJ, Fuller SD. 2006. Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog.* 2:e83. doi:10.1371/journal.ppat.0020083.
156. Zhou T, et al. 2010. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329:811–817.
157. Zhou T, et al. 2007. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 445:732–737.
158. Zhu P, et al. 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441:847–852.
159. Zolla-Pazner S, Cardozo T. 2010. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 10:527–535.
160. Zwick MB, Burton DR. 2007. HIV-1 neutralization: mechanisms and relevance to vaccine design. *Curr. HIV Res.* 5:608–624.
161. Zwick MB, et al. 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* 75:10892–10905.
162. Zwick MB, et al. 2003. Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* 77:5863–5876.

Annexe 3:

Generation of HIV-1 potent and broad neutralizing antibodies by immunization with post-fusion HR1/HR2 complex

**R. Dawood^a, F. Benjelloun^a, J.J. Pin^b, A. Kone^a, B. Chanut^a, F. Jospin^a,
F. Lucht^a, B. Verrier^c, C. Moog^d, C. Genin^a and S. Paul^a**

The envelope glycoproteins are major targets for HIV vaccines. The N-terminal and the C-terminal regions of the gp41 interact to form six helix bundles which are responsible for the fusion between the viral and the target cell membranes. Monoclonal antibodies (mAbs) able to disrupt the formation of this complex or to interfere with it could inhibit HIV fusion. Most of the well described gp41-specific broadly neutralizing Abs target conformational epitopes within the membrane proximal region of gp41 (MPER) and recognize linear peptides. In this study, a stable human transfected cell line, expressing a well folded HR1/HR2 post-fusion complex has been developed. Transfected cells were highly immunogenic in mice and allowed the generation of 40 complex specific B cell clones. Three of them were able to neutralize efficiently both HIV-1 laboratory adapted virus and primary isolates from different clades. Two neutralizing Abs (Nabs) FC-2 and FC-3 bound to a recombinant folded gp140 and blocked with a high potency HR1/HR2 fusion complex formation *in vitro*. The conformational epitopes of the three antibodies are different to 2F5, 4E10, D5 or NC-1 and mainly located in the MPER region. Abs were capable to inhibit syncytium formation by blocking spatial interactions between HR1 and HR2 regions. These findings suggest that immunogenicity of gp41 is achievable and that the use of a fusion complex expressing human cell line is an highly potent immunogen to generate neutralizing antibodies against gp41 envelope glycoprotein.

© 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2012, 27:000–000

Keywords: antibody, fusion complex, gp41, HR1/HR2, neutralization

Introduction

The HIV-1 envelope (Env) glycoprotein is the main target for neutralizing antibodies. A major challenge in HIV-1 vaccine research remains to identify an immunogen that has the capacity to induce high titers of broadly neutralizing antibodies [1–3]. The HIV-1 genome and especially its env gene is highly variable between and within clades [4], which is partly responsible for the difficulty in developing a suitable vaccine candidate [5]. Env specific neutralizing antibodies mainly target the spikes on the surface of infectious virions [2,3,6].

Trimeric Env is composed of the receptor binding domain gp120, which is non-covalently associated with the membrane-anchored fusion protein gp41. Infection of target cells is initiated by the attachment of Env to the CD4 receptor [7,8], which triggers conformational changes that expose the hypervariable loop 3 (V3) [9], thus priming it for co-receptor CCR5 or CXCR4 interaction [10,11]. Together CD4 and co-receptor (CCR5 or CXCR4) interactions are thought to induce conformational changes in the fusion protein subunit resulting in exposure and subsequent insertion of the fusion peptide into the target cell membrane which produce the fusion intermediate pre-hairpin structure

^aGIMAP EA3064, Faculté de Médecine de Saint Etienne, Université de Lyon, France, ^bDENDRITICS SAS, Bioparc Laennec, Lyon, France, ^cInstitut de Biologie et Chimie des Protéines, FRE 3310 CNRS/UCBL, Lyon, France, and ^dINSERM-U748, Institute of Virology, Strasbourg, France.

Correspondence to Dr Stéphane Paul.

E-mail: stephane.paul@chu-st-etienne.fr

Received: 20 July 2012; revised: 12 November 2012; accepted: 23 November 2012.

DOI:10.1097/QAD.0b013e32835cfca5

that bridges viral and cellular membranes [6,12]. During this process two helical heptad repeat regions 1 (HR1) and 2 (HR2) are transiently exposed [13] allowing interaction with peptide inhibitors of fusion such as T-20 [14,15]. This structure consists of a bundle of six α -helices, in which three CHR (C-terminal Heptad Repeat) peptides pack in an anti-parallel manner against a central three-stranded coiled-coil formed by the HR1 regions of the same gp41 monomers [16–18]. Subsequent refolding of the pre-hairpin structure into the post-fusion conformation leads to the contact of viral and cellular membranes catalyzing pore formation and membrane fusion [16,17,19–22].

The fusion-intermediate conformation of gp41 is an attractive target for neutralizing antibodies due to its relative high sequence conservation and low degree of glycosylation. These antibodies are considered to be able to prevent HIV-1 infection by interfering with post attachment steps leading to virus membrane fusion.

Cross-clade neutralizing antibodies 2F5, 4E10 and Z13 target the membrane proximal region most likely during epitope exposure in the fusion-intermediate pre-hairpin conformation [23–25]. Although conformation and lipid environment may be crucial for their activities, these mAbs bind to linear epitopes of membrane proximal region of gp41 [26–30]. 2F5 is mapped to the conserved sequence ELDKWA [31], whereas 4E10 and Z13 recognize an epitope involving the sequence NWF(D/N)IT located in the C-Term domain of the 2F5 epitope [32]. The mAbs 3D6 and 5F3 exhibiting low neutralizing activity restricted to limited HIV-1 clades recognized the GCSGKLICTTAVPW 17 AA gp41 region [33] or an epitope involving the sequence (QNQQEKNE) located upstream to the MPER region, respectively. The recombinant mAb CAP206-CH12 recently described used a portion of the distal MPER from HXB2 and neutralized a subset of HIV-1 pseudoviruses [34]. Failure to elicit broadly neutralizing antibodies against the membrane proximal external region of HIV-1 gp41 reflects the difficulty of mimicking its neutralization-competent structure. The pivotal role of the transmembrane region of the gp41 in MPER exposure has been recently demonstrated [35].

Antibodies directed against HR1/HR2 complex exist in the sera of HIV-1 infected individuals. Specific HR1/HR2 antibodies have been purified from patients with an HR1/HR2 (C34) fusion complex and exhibit potent neutralizing activity against various primary isolates [36]. Several HR1-specific monoclonal antibodies targeting the pre-hairpin conformation of gp41 have been isolated from phage display libraries with variable neutralization profiles depending on the assays used. NC-1 is a murine monoclonal antibody (mAb) that specifically recognizes the six helix bundle core of the HIV-1gp41[37]. NC-1 antibody is devoid of neutralizing activity. The D5 mAb

was isolated from a naïve human library and identified as an antibody directed against the highly conserved hydrophobic pocket in the groove formed by the trimeric coiled-coil of the gp41 N-helices[38]. MAb DN9 from a Fab library has been generated from bone marrow RNA from an HIV-1 infected individual [39], while the rabbit single chain mAb 8K8 was derived from a phage library [39] prepared from rabbits immunized with a gp41 HR1 mimetic [40]. More recently, HK20 mAb has been isolated from immortalized memory B cells of an HIV-1 infected individual, which targets the conserved hydrophobic pocket in HR1 [41,42]. HK20 seems to have an important breadth of neutralization. However, the HK20 neutralizing activity remains very low and seems to be target-cell dependent. Although this region is highly immunogenic, immunization strategies employing HR1 peptide mimetics led to the generation of a polyclonal antibody response capable of neutralizing only Tier 1 primary isolates [43–45]. Crystal structures of N-HR mimetic 5-helix with specific Fabs suggest that both neutralization properties and affinity for the target can be attributed to the differences in the interactions of the CDR-H2 loops with the antigen [46].

In this study, we focused on eliciting neutralizing antibodies that target HR1/HR2 complex of gp41. To improve the immunogenicity of the complex, we have developed a human HEK 293 cell line which expressed a transmembrane folded pre-hairpin fusion complex on its surface. This immunogen is recognized by well-known antibodies targeting HR1/HR2 complex such as NC-1 or D5. Transfected cells were highly immunogenic in mice and allowed the generation of 40 complex-specific B cell clones. Three Nabs are specific for gp41 and two (FC-2 and FC-3 for Fusion Complex) bound efficiently to a recombinant folded gp140 and recognized very specifically HR1/HR2 fusion complex. These antibodies were also able to efficiently block the formation of the complex and to inhibit syncytium formation. Finally, the three Abs demonstrate distinct profiles of neutralization both on HIV-1 laboratory adapted virus and primary isolates from different clades.

Methods

Reagents

The following materials were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pSVIII-93BR025.9 plasmid (Gene Bank number U09126), primary HIV-1 isolates (SF162, 92US660, and 93BR025), the SHIV 89.6P Subtype B env (20-mer) Peptides Complete Set, NC1, 2F5, 5F3, NC-1 mAbs and the CHO-WT cell line. Gp140 recombinant protein (strain 97/CN/54, clade C/B) and 3D6, 4E10, Z13 mAbs were obtained from Polymun Scientific (Vienna, Austria). Gp41 ectodomain

from HXB2 strain was produced in *E. coli*. D5 mAbs was kindly provided by Dr Miller (Merck & Co, NJ, USA) [38]. Human HEK 293 and Hela CD4⁺ cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). SP2/0 cells were obtained from Dendritics (Lyon, France).

Cloning of gp41

The plasmid pSVIII-92BR025.9, containing the full sequence of clade C HIV-1 envelope protein, was used as a template for the amplification of the HR1-PID-HR2-TM by using specific primers. A stop codon has been inserted at the end of the gp41 TM region. The PCR products obtained were purified by Qiagen purification kit (Courtaboeuf, France), then were digested with SmaI/PstI and cloned in the pDisplay expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). Plasmids were then transformed into *E. coli* strain DH5 α using thermal shock method followed by extraction and purification using Qia-prep Miniprep kits (Qiagen) and large scale Midiprep kits (Qiagen). Quality of the constructs was verified by enzymatic digestion method and by automated DNA sequencing.

Establishment of gp41 expressing cell line

HEK 293 cell culture was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium with stable L-glutamine and high glucose level (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, US) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1X non essential amino acids at 37°C with 5% CO₂. Transfection was made using LYOVEC (Invitrogen) as according to the manufacturer's recommendation. The selective agent G418 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, US) was added to a final concentration of 0.5 mg/ml 48 h after transfection. After 10 days of culture, transfected cells were analyzed by immunofluorescence. Then, limiting dilution of transfected cells has been made. Analysis of gp41 expression on HEK 293-gp41^{MSD} (MSD = Membrane Spanning Domain of gp41) cells was performed both by flow cytometry and by immunofluorescence.

To study the expression of the gp41 at the cell surface by flow cytometry, HEK 293-gp41^{MSD} cells were tested with different anti-gp41 human monoclonal antibody, Z13, 2F5, 5F3 at 5 μ g/ml for 30 min at 4°C. The cells were washed three times with FACS buffer and then incubated with R-Phycoerythrin R-PE goat anti-human IgG (Sigma) for 30 min at 4°C. After washing, cells were analyzed by flow cytometry. At least, 10,000 events were analyzed on FACScan (BD Pharmingen).

The anti-gp41 mAbs (3D6, 2F5, and 4E10) were used at 15 μ g/ml for the validation of the cell line by indirect immunofluorescence and using the anti-myc conjugated with FITC for direct immunofluorescence followed by a second step with FITC conjugated goat anti-human IgG. The visualization of labeling was observed by fluorescent

microscopy software (Nikon TE 2000 Microscope, Burlingame, CA, US) using NIS-Elements software.

Immunization of mice and monoclonal antibody production

BALB /c mice (6–8 weeks old, n=3) were intraperitoneally (i.p) immunized with 2x10⁶ cells of HEK 293-gp41MSD in complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma Aldrich) followed by one i.p. injection with 2x10⁶ cells in incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma Aldrich) at day 14, one i.p. injection with 2x10⁶ cells in PBS at day 21 and finally one intravenous boost with 4x10⁶ cells in PBS at day 28. Use of CFA/IFA adjuvants allow to reduce the number of human HEK cells for immunization, to increase the number of accessible epitopes in the emulsion and finally to facilitate the migration of APCs to the spleen. All mice were sacrificed 3 days after the last boost. The splenocytes were fused immediately with myeloma cells SP20 by using polyethylene glycol-1000 as fusion reagent (15). The hybridoma cells were cultured in DMEM-F12-Glutamax medium supplemented with 10% horse serum (Gibco), 0.1 mM hypoxanthine, 0.5% azaserine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin in 96-well plates, until that the colonies of hybridoma cells were grown. Initially, the hybridoma cells were diluted in round bottom 96-well plates by limiting dilutions to obtain 0,3 cell per well and cultured for 7 days.

Specificity of mAbs by ELISA assay

The specificity and the reactivity of hybridomas were measured by ELISA against HEK 293-gp41^{MSD} cell line to identify the specific antibody producing clones. Briefly, the HEK 293-gp41^{MSD} cells were cultured for 2 days in 96-well plates and fixed in cold acetone. Then, hybridoma supernatants were harvested after 6 days, and then incubated for 30 min on fixed HEK 293gp41^{MSD} cells. Antibody binding was then revealed with HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG (Biosys) at a 1:200 dilution in PBS for 30 min at 37°C. The substrate o-phenylenediamine di-hydrochloride (OPD) substrate (Sigma) was added to the plate. Optical density was measured at 492 nm. Forty clones were selected, exhibiting a strong reactivity against the cell line. Positive clones showing neutralization activity were expanded using a high density culture system (Integra cell line CL1000; Integra Biosciences) (Abbott lab., Abbott Park, IL, US) [47]. After sodium sulfate precipitation, the mAbs were purified by anion exchange chromatography on a Hyper-D column (Sepracar, France).

Analysis of the mAbs specificity by flow cytometry

To test the binding specificity of the generated antibodies, we used flow cytometry to analyze FC-1, FC-2, and FC-3 specificity against HEK 293-gp41^{MSD} cell line. Cells were separated from the culture flasks using versene buffer (GIBCO, GrandIsland, NY, USA). The cells were washed

twice with RPMI 1640 without phenol red containing 5% horse serum and 0.1% sodium azide (FACs buffer). Gp41 expressed cells (1×10^6) were incubated with 100 μ L of the three generated antibodies at 15 μ g/ml for 30 min at 4°C. Cells were washed and incubated with 100 μ L fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse IgG (diluted 1:10,000 in FACs buffer) for 30 min at 4°C. Subsequent to washing, the cells were analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

Virus neutralization assays

Measure of the neutralizing activity of purified gp41-specific antibodies was performed using T cell line adapted strain LAI (clade B) or primary isolates of clade A (92UG029), B (BAL, SF162, 92US660 and QHO), C (93BR025) and D (92UG001). Neutralizing activities were tested in duplicate and repeated three times.

For LAI assay, CD4⁺/CXCR4⁺ SupT1 cells were incubated at 37°C under 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% FCS. Infection was performed in 96-well rounded bottom plates. Purified antibodies or hybridoma supernatants (50 μ L) in the case of the primary screening were incubated with an equal volume of virus containing a 100 TCID₅₀ dose for 2 h at 37°C. Then, 3×10^5 /well of SupT1 cells were added. The next day, infected cells were washed twice with tissue culture medium. Supernatants were collected 7 days post infection and p24 ELISA measurement was performed (HIV-1 p24 Antigen Capture Assay; Advanced Bioscience Laboratories, Inc. USA).

For the BaL strain, neutralizing activity of purified antibodies was determined as previously described [36]. Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors (generous gift from EFS Auvergne Loire, France) and stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (5 μ g/ml) and 200 U/ml of recombinant human interleukin-2 (Abcys, Paris, France). The cells were infected with a 100 TCID₅₀ dose for 2 h at 37°C in the presence of purified antibodies and after 48 h, the cells were washed twice. Infected supernatants were collected 7 days post-infection and ELISA p24 measurement was performed.

Neutralizing activity of purified antibodies was also tested on stimulated PBMC infected with 92UG029, 92US660, 92BR025, 93BR025, HIV-1 G3 and 92UG001 primary HIV-1 isolates as previously described (36). The cells were infected with a 100 TCID₅₀ dose in the presence of serially diluted antibody. The supernatants were collected 14 days post-infection and p24 measurement was performed. In the particular case of the primary HIV-1 isolates SF162 and QHO, neutralizing activity was measured as previously described [48,49].

The percentage of neutralization was calculated as the reduction of p24 production (for BaL 92UG029, 92US660, 92BR025, 93BR025, HIV-1 G3 and 92UG001) or intra-cellular p24 staining (for SF162 and QHO) compared with the control value of p24 obtained in the absence of antibody. IC₅₀ and IC₈₀ were determined as the antibody concentration able to confer 50% and 80% of neutralization, respectively.

Epitope mapping of mAbs

ELISA was carried out using the SHIV 89.6P (subtype B) env 20-mer peptides complete set which cover and overlap the gp41. Briefly, each peptide was coated on a 96-well plate (Maxisorp, Nunc) at 5 μ g/ml in 0.1 mol/l sodium carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. The plates were washed with tris-buffered saline (TBS) (144 mmol/l NaCl, 25 mmol/l Tris -HCL, pH 7.5) containing 0.5% tween 20 and blocked with the same buffer and 2% BSA for 1 h at 37°C. After washing, 100 μ L of the generated antibodies (5 μ g/ml) diluted in TBS were added to the wells and incubated 2 h at 37°C. After washing, the detection was done by using horseradish peroxidase HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and OPD substrate. The measurement of absorbance was read at 492 nm. All assays were performed in duplicate (Multiskan Microplate Photometer, thermo scientific).

Competition assays for antibody epitope mapping

1×10^6 cells HEK 293-gp41^{MSD} were first incubated with FC-1, FC-2, FC-3, 2F5, 4E10, D5 or NC-1 unlabelled antibodies at different concentrations (500, 250, 125 or 50 μ g/ml) during 30 min at room temperature. After washing, cells were then incubated with Alexa647 labeled FC-1, FC-2 or FC-3 for 30 min at room temperature. FC-1, 2 and 3 labeling was done accordingly the manufacturer instructions as described by Molecular Probes (Alexa Fluor R 647 Protein Labeling Kit, InVitroGen). After washing, cells were then analysed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

HIV Envelope mediated cell-cell fusion assay

4×10^5 chinese hamster ovary (CHO) cells (target cells) stably transfected with a HIV-1 HXB2 Env expressing vector pEE 14 (CHO-WT) (Env cells) were added in each well of 24-well culture plate in glutamine-deficient minima essential medium (GMEM-S) containing 400 μ mol/L methionine sulfoximine (Gibco, Grand Island, NY, USA). Purified monoclonal antibodies were then added at different concentrations into the wells and mixed adequately. After 4 hr incubation at 37°C under 5% CO₂, 4×10^5 Hela CD4 cells were added to each well. After 22 h incubation at 37°C under 5% CO₂, syncytia were stained by Giemsa (Sigma, France) and counted under microscope. The number of syncytia was calculated at five different fields in a well.

Inhibition of fusion complex formation

The proteins HUG037H2 (92UG037 clade A) and HTH22H2 (92TH022 clade EA) representing the HR2 region and the protein HBR025H1 (92BR025 clade C) representing the HR1 region were produced in *E. coli* and purified as previously described [36]. To measure the ability of mAbs to block HR1/HR2 complexes formation, a specific ELISA assay was developed. A Ni-NTA HisSorb plate (Qiagen) was coated with purified HR2 (500 µg/ml) at room temperature for 2 h. Purified HR1 (200 µg/ml) was mixed with the three mAbs (10 µg/ml) or with an irrelevant anti-OVA mAb at 37°C for 45 min. The mixture was then added to wells followed by adding D5 anti-gp41 and horseradish peroxidase HRP-conjugated goat anti-human IgG and OPD substrate sequentially. The optical density (OD) was measured at 492 nm.

Statistical analysis

The statistical difference in *in vitro* experiments between control and antibodies was assessed using Student's t test (Statistica 5.1 software, Statsoft Inc.). A $p \leq 0.05$ has been considered statistically significant.

Results

In order to induce gp41-specific neutralizing antibody, we have decided to generate a potent conformational immunogen based on a human cell line which allowed the expression of a natural conformational membrane-bound gp41 as present in viral particles.

Construction and characterization of the human HEK 293-gp41^{MSD} cell line

The HR1-PID-HR2 was amplified on the plasmid pSVIII-92BR025.9 with specific primers. The HR1-PID-HR2 fragment encodes a fragment of 516 base pairs or 172 amino acid residues which has been cloned in frame into pDisplay vector and verified by DNA sequencing (Fig. 1A). Recombinant plasmid was then used to transfect the human HEK 293 cells as described in the methods section. After selection, a clonal dilution was realized at 0.5 cell/well and more than 50 individual clones were analyzed for transmembrane gp41 expression. One clone has been selected on the basis of its stability and the high level of gp41 expression both on the surface and in the cytoplasmic content of the HEK 293-gp41TM transfected cells by immunofluorescence (Fig. 1B). Gp41 transmembrane expression was confirmed by specific immunolabeling of HEK 293-gp41^{MSD} cells with the well-known gp41-specific IgG (Z13, 2F5, and 5F3) but not with a well known gp120-specific antibody b12 as shown in Fig. 1C. All the three antibodies recognized very specifically the HEK 293-gp41^{MSD} transfected cells as compared to untransfected cells.

To evaluate the formation of the gp41 post-fusion complex on the HEK 293-gp41^{MSD} cells, NC-1 and D5 mAbs specific of conformational epitopes were used (Fig. 1D). We observed that almost all the HEK 293-gp41^{MSD} cells were stained with NC-1 specific for the 6-helix bundle post-fusion conformation. Only 19% of cells were stained with D5 mAb which indicates that the HR1 epitope is weakly accessible and that the expressed fusion complex might be an intermediate conformation.

Specificity of the three monoclonal antibodies by flow cytometry and ELISA

The HEK 293-gp41^{MSD} cells were used to immunize Balb/C mice as described in the method section. Immunizations were made in presence of Freund's adjuvant to optimize antigen presentation. The micelle structure obtained by performing a stable emulsion between adjuvant and cellular proteins from transfected cells allows the immune system to present a higher number of protein epitopes than most other adjuvants. The presence of plasma membranes of Mycobacterium tuberculosis in adjuvant allows the recruitment of competent dendritic cells at the injection site so far superior to all the compounds in the proposed unit.

Three successive immunizations were made and more than 200 hybridoma clones were obtained. Sera from immunized mice were shown to exhibit specific binding to HEK 293-gp41^{MSD} cells and not to untransfected cells and potent neutralizing activity on the LAI HIV-1 strain (Supplementary Figures 1A and 1B). However this neutralizing activity remains very low. Hybridomas were tested for their immunoreactivity against HEK 293 or HEK 293-gp41^{MSD} cells. Culture supernatants of confluent cells were analyzed by immunofluorescence. Among the 200 clones, 40 exhibited a strong specific reactivity against the HEK 293gp41^{MSD} cells. The other clones were all specific for untransfected cells revealing the strong immunogenicity of HEK 293 in mouse.

Supernatants of these 40 clones were screened for their neutralizing activity in a neutralizing LAI/SupT1 assay. Among the 40 clones, only three (referred as FC-1, FC-2 and FC-3) exhibited a strong neutralizing activity *in vitro* (more than 80% neutralization with supernatant diluted to 1/4), neutralizing activity of the other 37 clones being less than 80%.

The three clones were amplified and produced at high density to obtain high amount of each specific antibody. Hybridoma supernatants were pooled and used to purify specific IgG on a Hyper-D column. Purity of the antibody was estimated higher than 95% (Supplementary File 2). The production rate of each individual antibody has been quantified around 10 µg/ml of hybridoma supernatant.

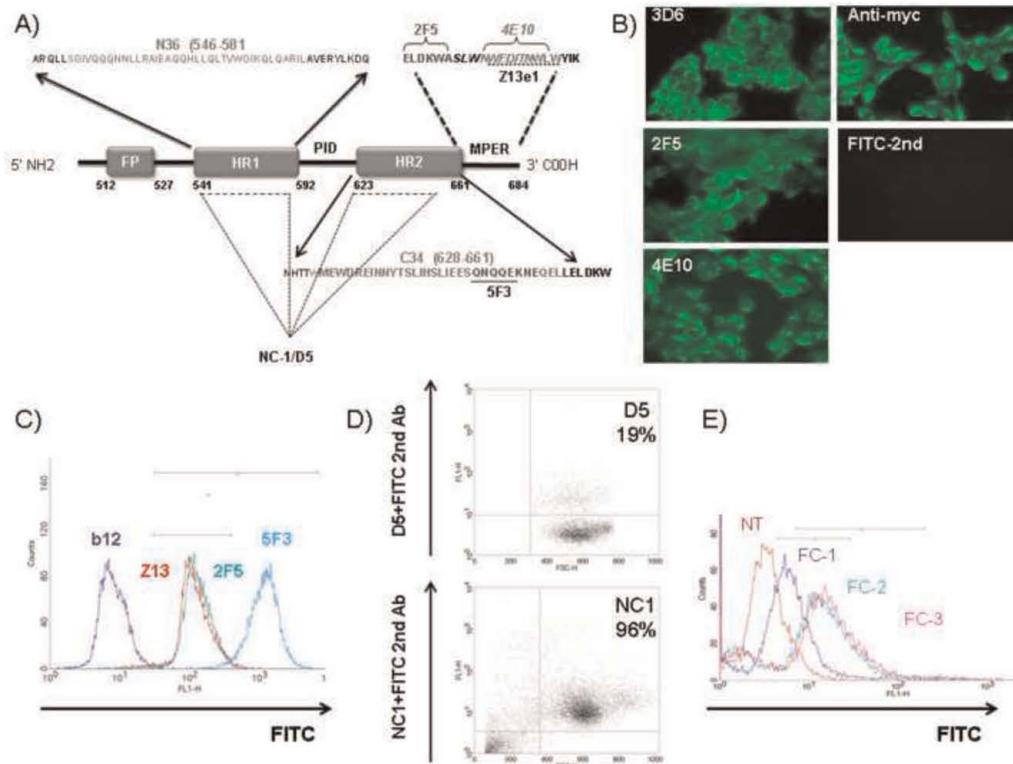


Fig. 1. ?? (1A): Schematic representation of the cloned HIV-1 gp41 domain (HR1-PID-HR2) in pDisplay vector. (FP) fusion peptide, (HR1) heptad repeat region 1, (PID) principal immunodominant region, (HR2) heptad repeat region 2, (MPER) membrane proximal external region. The amino-acid residues and their position number are indicated. Epitopes for 2F5, 4E10, Z13, 5F3, D5 and NC-1 are described with the N36 entire sequence. (1B) Transmembrane HR1-PID-HR2 expression at the HEK 293-gp41^{MSD} cell surface was detected by immunofluorescence with human anti-gp41 3D6, 2F5, 4E10 followed by FITC-2nd antibody, with FITC anti-myc or with FITC-2nd antibody alone. (1C): Histogram generated by flow cytometry analysis shows the detection of the gp41 at the cell membrane surface of HEK 293-gp41^{MSD} cell line using anti-gp41 antibodies Z13, 2F5, 5F3 followed by FITC-2nd antibody. Labelling of HEK 293-gp41^{MSD} cell line with the gp120-specific antibody b12 antibody was used as negative control. (1D): Measure of the binding of NC-1 or D5 mAb followed by FITC-2nd antibody to HEK 293-gp41^{MSD} by flow cytometry analysis. The upper right quadrant represents the percentage of NC1⁺ or D5⁺ HEK 293-gp41TM cells. Labelling of HEK 293-gp41^{MSD} cell line with the gp120-specific antibody b12 was used as negative control (data not shown). (1E) Specificity of FC-1, FC-2 and FC-3 by flow cytometry analysis on HEK 293-gp41^{MSD} cell line. Abs staining was revealed with an anti-mouse IgG secondary antibody coupled with FITC. Staining of untransfected cells (NT) with a mix of FC-1, FC-2 and FC-3 was used as negative control.

Specificity of the mAbs was tested by both flow cytometry analysis on HEK 293-gp41^{MSD} and specific ELISA assay. A concentration of 5 µg/ml of mAbs allowed the detection of gp41 on the cell surface of HEK 293-gp41^{MSD} with a great specificity (Fig. 1E). FC-2 and FC-3 seems to recognize better gp41 conformation at the HEK 293-gp41^{MSD} cell surface. None of the three clones recognize untransfected cells (Fig. 1E). The specificity of the three mAbs by cell-coated ELISA with the HEK 293-gp41^{MSD} cells was also confirmed. Again, FC-2 and FC-3 seem to have a better affinity (data not shown).

Mapping of binding sites of the three monoclonal antibodies

Mapping of the specific epitopes of each mAb was determined by ELISA with a SHIV 89.6P (subtype B) env peptides complete set (Table 1). Binding of each mAb was also tested on recombinant gp140 from Clade C/B (CN54) produced in CHO as positive control (Table 1). FC-1 recognized a linear epitope located in the HR2 region (peptide 4767; AA 671–690; FDITNWL-WYIRLFIMIVGGL) while FC-2 and FC-3 bound specifically to a conformational epitope formed by the

Table 1. Epitope mapping by ELISA of the three clones using the SHIV 89.6P env library.

Peptide Name	Amino Acid Position and Sequence	Reactivity (Optical Density)				
		FC-1	FC-2	FC-3	D5	NC-1
4753 (FPPR; SHIV 89.6P)	531-550 ASVTLTVQARLLLSGIVQQQ	nb	0.76 +/- 0.04	0.45 +/- 0.01	nt	nt
4754 (HR1; SHIV 89.6P)	541-560 LLLSGIVQQNNLRAIEAQ	nb	nb	nb	nt	nt
4755 (HR1; SHIV 89.6P)	551-570 NLLRAIEAQNMRLTWVG	nb	nb	nb	nt	nt
4756 (HR1; SHIV 89.6P)	561-580 QNMLRLTWGKQLQARVLA	nb	nb	nb	nt	nt
4757 (HR1; SHIV 89.6P)	571-590 IKQLQARVALERLDRDQL	nb	nb	nb	nt	nt
4758 (HR1; SHIV 89.6P)	581-600 LERYLRDQQLMGVWCGSGKL	nb	nb	nb	nt	nt
4759 (PID; SHIV 89.6P)	591-610 MGIWGCCKLICTTSVPWNV	nb	nb	nb	nt	nt
4760 (PID; SHIV 89.6P)	601-620 ICTTSPWNVSVSNKSVDDI	nb	nb	nb	nt	nt
4761 (PID; SHIV 89.6P)	611-630 SWSNKSVDIWNINMTWMEWE	nb	nb	nb	nt	nt
4762 (HR2; SHIV 89.6P)	621-640 WNNMTWMEWEIEDNYDYI	nb	nb	nb	nt	nt
4763 (HR2; SHIV 89.6P)	631-650 REIDNNTDYIDLLEKSTQ	nb	nb	nb	nt	nt
4764 (HR2; SHIV 89.6P)	641-660 YDLEKSTQCEKNEKELLE	nb	nb	nb	nt	nt
4765 (MPER; SHIV 89.6P)	651-670 QEKNEKELLEDKWASLWNV	nb	nb	nb	nt	nt
4766 (MPER; SHIV 89.6P)	661-680 LDKWASLWNVFDITNWLWYI	nb	nb	nb	nt	nt
4767 (MPER; SHIV 89.6P)	671-690 FDTNWLWYRIFMIVGGI	0.47 +/- 0.02	0.91 +/- 0.03	0.68 +/- 0.01	nt	nt
4768 (MPER; SHIV 89.6P)	681-700 RLFIWVGGHGLGRIVFVGL	nb	nb	nb	nt	nt
4769 (MPER; SHIV 89.6P)	691-710 IGLRIVFAVLSVNRVQGY	nb	nb	nb	nt	nt
N36/C34 complex	546-581 SGVQQNNLLRAIEAQQH LLQLTWGKIQIQARI 628-661 WMEWDREINNYTSLHSLIEES QNQQEKNEQELL	nb	nb	nb	0.81 +/- 0.04	0.64 +/- 0.09
4753/4767 complex	531-550 ASVTLTVQARLLLSGIVQQQ	nb	1.1 +/- 0.1	0.94 +/- 0.08	0.59 +/- 0.05	0.64 +/- 0.08
Gp140 (CN54; clade B/C)	671-690 FDTNWLWYRIFMIVGGI	nb	0.89 +/- 0.01	0.95 +/- 0.01	0.58 +/- 0.1	0.74 +/- 0.07
Cp41 (HXB2; clade B)		0.66 +/- 0.046	0.885 +/- 0.09	1.245 +/- 0.11	0.783 +/- 0.08	1.01 +/- 0.07

Each individual peptide tested is mentioned. Recombinant gp140 and N36/C34 complex have been also tested. Data represent mean values ±SD of three determinations. OD values were all corrected for non-specific binding in blank controls. (nb: no detectable binding; nt: not tested).

HR1 region (peptide 4753; AA 531–560; ASVTITV-QARLLLSGIVQQQ) and to the same fragment of the HR2 recognized by FC-1 (peptide 4767; AA 623–661; FDITNWLWYIRLFIMIVGGL).

In an attempt to further identify the ability of the three mAbs to detect the spatial structure of the HR1/HR2 fusion complex, we have measured the capacity of these antibodies to specifically recognize different fusion complexes generated *in vitro*. We have used the N36/C34 and the complex formed by mixing the two well recognized peptides 4753/4767 as fusion complex model (Table 1). The formation of the complexes has been verified by ELISA with D5 and NC-1 antibodies. FC-2 and FC-3 bound with a great efficiency to the complex formed with 4753/4767 peptides and to a reduced level with other constructed complexes based on HR1 and HR2 domains produced in *E. coli* (data not shown). No binding of the different mAbs was observed with the N36/C34 complex. Absence of binding to N36/C34

complex is probably due to the absence of the 13 residues of the reactive 4753 peptide in N36 sequence. According to the mapping, the C34 sequence was not included in the C-Term region recognized by FC-2 and FC-3. A possible correspondence between the reactivity of the individual peptide 4753 and the absence of N36/C34 recognition could suggest that the SGIVQQQ sequence is contained in the HR1 epitope part of FC-2 and FC-3. FC-1 seems to recognize a linear epitope located in HR1.

Competition assays for antibody epitope mapping

Epitopes for FC-1, FC-2 and FC-3 were also studied by competition experiments on HEK 293-gp41^{MSD} cell line. Briefly, saturating concentrations of different gp41-specific antibodies were used before labeling of cells with Alexa647 labeled FC-1, FC-2 or FC-3 (Fig. 2). These experiments indicate first that the epitopes of FC-1, FC-2 and FC-3 are different that those described for 2F5, 4E10, D5 or NC-1. The epitopes are certainly conformational

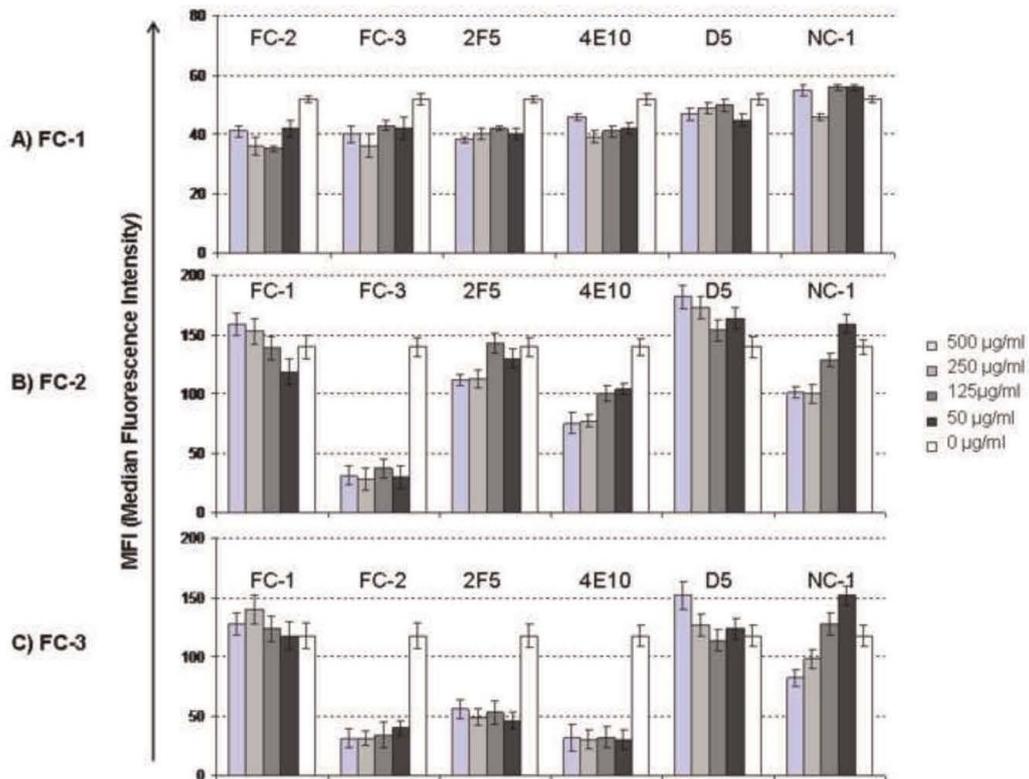


Fig. 2. Epitope mapping of FC-1, FC-2 and FC-3 by competition assay on HEK 293-gp41^{MSD} cell line. Cells were incubated with saturating concentration of different unlabeled antibodies against different regions of gp41 (FC-1, FC-2, FC-3, 2F5, 4E10, D5 and NC-1) and then revealed with Alexa647 labeled FC-1 (A), FC-2 (B) and FC-3 (C). The values of MFI (Median Fluorescence Intensity) were monitored by flow cytometry and reported on histograms.

in the view of the heterogeneous inhibition observed. Epitope of FC-1 has been mapped in HR2 and none of the antibodies tested is capable of blocking its binding to HEK 293-gp41^{MSD} cell line (Fig. 2A). FC-2 epitope is very close from FC-3 and 4E10 epitopes (Fig. 2B). FC-3 epitope seems to be conformational and encompass a region containing FC-2, 2F5 and 4E10 epitopes probably MPER. FC-2 and mainly FC-3 epitopes seems to be masked by NC-1 which is specific for the 6-helix bundle post-fusion conformation. Thus indicate the capacity of FC-2 and FC-3 to block the fusion complex formation. Any competition was observed with D5 specific for the HR1 region.

Virus neutralization of the three monoclonal antibodies against primary HIV-1 isolates from different clades

To investigate the neutralizing effect of the three antibodies, we first confirmed the neutralizing activity against the TCLA strain LAI. The clones FC-1, FC-2 and FC-3 are able to efficiently neutralize at 80% the LAI strain at 0.78, 12.5 and 1.5 µg/mL, respectively. Next, the 3 mAbs were also analyzed for their ability to neutralize primary HIV-1 isolates of clade A (92UG029), clade B (BaL, SF162, QHO692 and 92US660), clade C (92BR025) and clade D (92UG001). The overall results of neutralization (IC50 and IC90) are summarized in Table 2. Neutralization curves obtained for the representative primary isolates 92BR025, 92UG001, 92US660 and 92UG029 are described in Fig. 3 as examples of neutralizing or none-neutralizing strains.

The three antibodies were able to efficiently neutralize BaL, SF162, 92UG029, 92UG001 93BR025, HIV-1 G3 and 92BR025 primary isolates with IC90 concentrations ranging between 0.6 to 100 µg/ml. FC-2 was the more potent of the three Nabs regarding IC90 (p < 0.05) but also as it is the only able to neutralize efficiently the Tier 2 primary isolate QHO692. None of them were able to decrease replication of 92US660 virus replication by 80%. As expected by the use of clade C gp41 expressing cell line, the three clones were able to neutralize the 92BR025 clade C strain. These data indicate that two of the three monoclonal antibodies inhibit a broad spectrum of clade neutralization (p < 0.05). In comparison with the well known gp41-specific 2F5 or 4E10 also tested in these experiments, neutralizing activity of FC-2 and FC-3 are significantly (p < 0.05) higher on primary isolates from clade A, B, C, D and G. Moreover, comparison with the two well known fusion complex specific antibodies D5 and NC-1 indicate that FC-2 and FC-3 have a significantly higher neutralizing activities (p < 0.05).

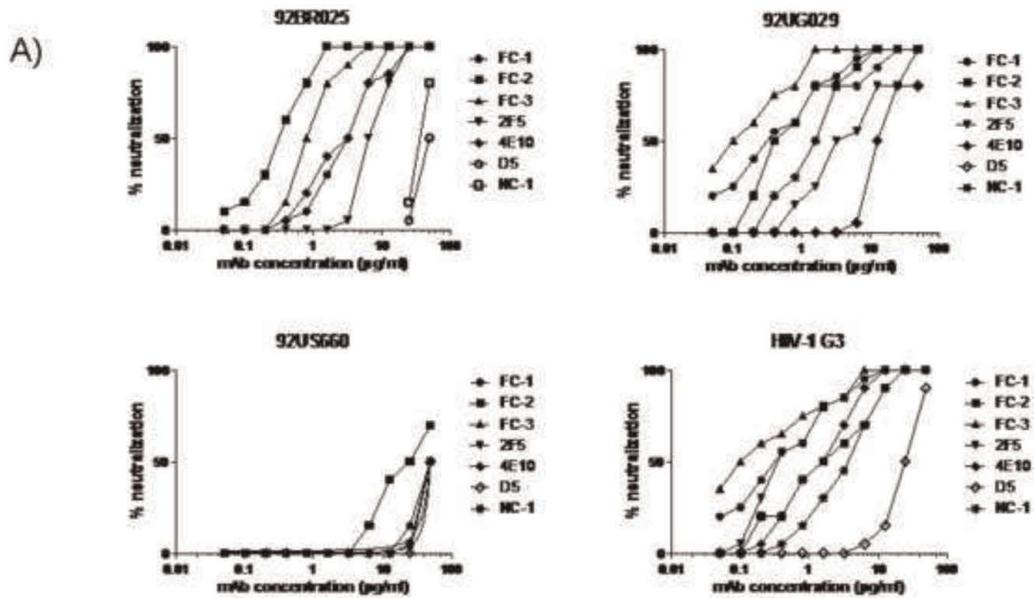
Cell-cell fusion inhibition

Interestingly, all three mAbs could inhibit HIV-1 Env-mediated membrane fusion of CHO-WT and Hela CD4 at a 10–15 µg/ml level (Fig. 4). FC-1 inhibited significantly syncytia formation by 40%, FC-2 by 70%

Table 2. Neutralizing activities of FC-1, FC-2 and FC-3 on laboratory strains and primary HIV-1 strains.

Strain (Tropism, Clade)	[NAb] for IC ₉₀ / IC ₅₀ (µg/ml)									
	FC-1	FC-2	FC-3	D5	NC-1	4E10	2F5	FC-1	FC-2	FC-3
LAI (CXCR4; B)	0.78	0.16	3.1	0.31	>100	25	25	>100	>100	>100
BaL (CCR5; B)	12.5	3.1	6.25	12.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
92UG029 (CXCR4; A)	1.5	0.31	0.78	0.16	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
SF162 (CCR5; B)	100	25	10	1.5	100	100	100	>100	>100	>100
QHO692 (CCR5; B)	>100	10	100	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
92US660 (CCR5; B)	>100	50	>100	50	>100	>100	>100	>100	>100	>100
93BR025 (CCR5; B)	3.1	1.5	0.78	<0.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
92BR025 (CCR5; C)	6.25	3.1	0.78	0.78	>100	25	25	>100	>100	>100
92UG001 (CCR5/CXCR4; D)	3.1	0.78	3.1	0.06	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
HIV-1 G3 (CCR5; C)	12.5	3.1	6.25	1.5	12.5	25	25	12.5	12.5	12.5

The table contains the antibodies concentration in µg/ml of the three purified mAbs used to obtain a neutralization of HIV infection ([NAb] at 50% or 90% as described in the method section). D5, NC-1, 4E10 and 2F5 mAbs were used as controls. (n.d., not done). The MAb neutralization titers have been color coded as follows: a white box indicates an IC₉₀ of >12.5 µg/ml, a green box indicates 3.1 µg/ml > IC₉₀ > 12.5 µg/ml and a red box indicates an IC₉₀ of < 3.1 µg/ml.



B)

	Number of syncytia / field	% of inhibition
FC-1	31, 35, 33, 38, 28	40±5 (p<0,05)
FC-2	25, 13, 17, 15, 16	70±10 (p<0,05)
FC-3	24, 20, 32, 10, 23	60±10 (p<0,05)
T20	0, 0, 0, 2, 10	100±10 (p<0,05)
untreated	49, 51, 67, 55, 53	0

Fig. 3. ?? A: Neutralizing activity of FC-1, FC-2 and FC-3 against 4 representative primary isolates 92BR025, 92US660, 92UG029 and HIV-1 G3. These mAb were tested for dose-dependent neutralization within a concentration range of 50–0,06 µg/ml, according to the neutralization assay protocol described in Methods. For each mAb and virus combination, the neutralization from one experiment, out of three repeated experiments, is shown. (3B) Inhibition of the HIV-1Env mediated syncytium formation between Hela CD4 and HIV-1 HXB2 Env-transfected CHO cells (CHO-WT) by FC-1, FC-2 and FC-3 at 10 µg/ml. T20 has been used as positive control of inhibition at 2,5 µg/ml. Table containing the number of syncytia counted per field for each condition and the median of the % of cell to cell fusion inhibition. Each experiment has been repeated 5 times with similar results, p values calculated by a student t test between untreated group and inhibitory conditions are indicated.

and FC-3 by 60% when syncytia were counted under microscope (Fig. 4B). T20 which blocks the gp41-dependent virus-cell fusion, was used as a control in the same cell fusion system [50]. T20 showed a complete inhibition of syncytium formation at 2.5 µg/ml.

Blocking of HR1/HR2 complex formation

We have developed a convenient method for detecting the formation of the gp41 fusion complex to study the inhibitory activity of mAbs. To evaluate the *in vitro* capacity of the three mAbs to interfere with the fusion complex formation, we have used two highly stable

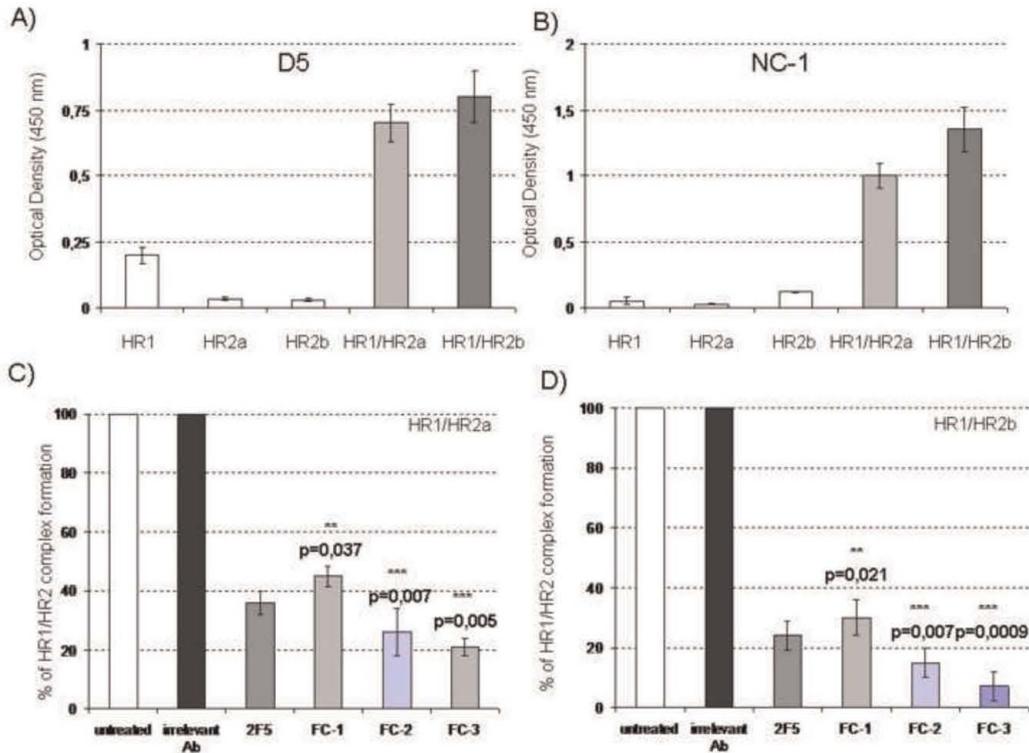


Fig. 4. Inhibition of HR1/HR2 complex formation by FC-1, FC-2 and FC-3. Recognition by ELISA of two distinct fusion complexes obtained by mixing of HBR025H1 (HR1; 92BR025) and HUG037H2 (HR2a; 92UG037) or HTH22H2 (HR2b; 92TH022) with D5 (5A) and NC1 (5B) mAb. Inhibition of the two HR1/HR2 complex formations (5C-5D) using FC-1, FC-2 FC-3, 2F5 or mouse IgG2 as an irrelevant mAb (10 μ g/ml). Complex formation was revealed with D5 antibody. Each experiment has been repeated 3 times with similar results. The p values are indicated.

complex model composed of recombinant HR1 (clade C) and HR2 (clade A and EA) domains produced in *E. coli* and available in the laboratory. These complexes are associated as dimer or trimer (data not shown) and are well recognized by D5 and also NC1 mAbs specific of the fusion complex (Figure 5A and 5B, respectively) indicating the correct folding of the six helix bundle core of the HIV-1gp41. Moreover, pre-incubation of the two complexes with D5 or NC-1 mAb does not alter complex recognition by FC-2 and FC-3 but reduce binding of FC-1 (data not shown).

We demonstrated that FC-1, FC-2 and FC-3 blocked efficiently and specifically two different heterologous HR1/HR2 trimeric complexes formation within 55%, 74% and 79% for HBR025H1/HUG037H2 and 70%, 85% and 95% for HBR025H1/HTH22H2, respectively (Fig. 5C and 5D). The inhibitions were highly significant for FC-2 and FC-3 in comparison to FC-1 and 2F5. No inhibition was measured with the irrelevant murine IgG2.

These results suggest that the three mAbs bound to HR1 or HR2 protein and interfere with the association between HR1 and HR2 regions.

Discussion

HIV-1 envelope glycoprotein is one the major target for humoral immune response in viral infection. Neutralizing antibodies were mainly directed against trimeric form of the envelop glycoprotein. Recent results report the presence of neutralizing antibodies directed against quaternary epitopes that are exposed on the YU2 gp140-folden trimer or directed against gp41 [5]. The high degree of variation in gp120 sequence and of glycosylation coupled with the highly conserved sequence of gp41 has long rendered gp41 an attractive target for inhibitors and NAb [32,51].

Entry inhibitors are a new class of drugs for the treatment of HIV infection. Enfuvirtide (T20) is the first compound of this family to be approved for clinical use [52]. T20 is a synthetic peptide that mimics an HR2 fragment of gp41, blocking the formation of a six-helix bundle structure which is critical in the fusion process. This compound is a potent therapeutic option as rescue therapy in combination with other active antiretroviral drugs against different HIV-1 variants, including all group M subtypes and group O [53]. The main mechanism of resistance to enfuvirtide depends on the selection of changes in a ten amino-acid domain between residues 36 to 45 in the HR1 region of gp41. Single and double mutations in this region have been shown to result in high level resistance to enfuvirtide [54,55].

Gp41 is highly immunogenic and elicits antibodies in almost all HIV-1 infected individuals. These titers are 25- to 625- fold higher than that of anti-gp120 antibody [56]. In addition, gp41 differs from gp120 in that all regions of the protein appear to be targeted by the human antibodies [57]. MAbs directed against gp41 region may neutralize viruses by blocking the formation of the fusion complex with target cells during infection [32,58,59]. Several broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibodies which bind to gp41 have been already described as 4E10, 2F5 or more recently 10E8 [1-3]. The majority of gp41-specific antibodies are mainly targeted to the MPER region.

The heptad repeat regions HR1 and HR2 of HIV-1 gp41 can be associated to form hetero-oligomers through helical coiled-coil interactions that are believed to play a key role in virus-induced membrane fusion. The HR1/HR2 complex was proposed to be the core structure of the fusion-active conformation of gp41. The high degree of conservation in the gp41 N- and C-HR sequences among HIV-1 strains of different clades makes these structures potential targets for inhibition. Antibodies that are able to interact with the core of the putative fusion-active gp41 may be useful in further unveiling the mechanism of HIV-induced membrane fusion [60]. Peptides representing these repeats are potent inhibitors of HIV infection [44]. They appear to block virus entry by mimicking helices of the six-helix bundle and forming a peptide-gp41 complex, which interferes with the formation of the gp41 six helix bundles in a dominant negative manner. Earlier study concluded that six-helix bundles can form prior to membrane fusion and that the pre-hairpin fusion intermediates can be accessible to antibodies [45]. The formation of the HR1-PID-HR2-TM viral structure was required because it is only transiently exposed during fusion of the virus with the host cell. Indeed, for this reason, neutralizing antibodies targeting this region are rarely elicited by natural infection or immunization. Some studies also indicate that such type of antibodies are autoimmune antibodies which normally cannot be induced in healthy individual.

However, a very recent study on the neutralizing potential of gp41 specific maternal antibodies and their correlation with HIV transmission in HIV-infected mother-child pairs highlight important epitopes in gp41 (HR1 and MPER) that appear to be associated to protection [61].

To generate such type of antibodies specific to the six-helix bundle structure present in the gp41 post-fusion conformation, a stable human cell line expressing HR1-PID-HR2 gp41 domain from a clade C primary strain at the cell surface has been produced. Clade C strain has been chosen as a representative of most currently circulating HIV-1 viruses. These cells have been used to immunize mice and to generate hybridomas producing gp41-specific antibodies. Antibodies were screened for their ability to inhibit the LAI adapted T cell virus in the SupT1 model. Although this type of screening could result in a bias towards selection of Abs neutralizing TCLA strains only, the three mAbs selected in this study (FC-1, FC-2 and FC-3) also neutralize at least 7 of the 8 primary isolates tested using conventional PBMC neutralization assay. With this assay, the IC90 of two fusion complex specific antibodies D5 and NC1 (non neutralizing antibody) and 2F5 and 4E10 was often observed at concentrations higher than 20 µg/ml [37,39,62-66]. FC-2 mAb and to a less extent FC-3 are able to neutralize at low concentrations most of the primary strain tested. In particular, FC-2 seems to be more potent than D5, NC-1, 2F5 or 4E10 in our neutralization assays. The relative higher neutralization efficiency of FC-2 and FC-3 in comparison with FC-1 could also be explained by a better recognition of gp41 conformation of these two mAbs. Envelope variability of the 92US660 primary strain could explain the apparent resistance of this strain for the three mAbs (data not shown).

Two mAbs (FC-2 and FC-3) have the capacity to recognize both the native envelope glycoprotein gp41 region and a new conformational epitope composed by the folding in the fusion complex of a first peptide located in the HR1 region (SGIVQQQ) and a second one located in the C-terminal part of gp41 containing HR2 (FDITNWLWYIRLRFIMIVGGL). This epitope is probably a conformational epitope present on the quaternary structure of the HR1/HR2 (pre)fusion complex as it has been previously described for the E1/E2 complex epitope of 2F5 or for the polar segment and MPR [67,68]. This explains the strong effect of FC-2 and FC-3 on the inhibition of HR1/HR2 complex formation. FC-1 is reactive with a linear epitope located in HR2/MPER as previously described with other antibodies (2F5 or 4E10). Competition experiments indicate that FC-1 epitope is certainly a linear epitope contained in HR2 region. The epitopes for FC-2 and FC-3 seems to be different and conformational. FC-2 epitope is very close from FC-3 and 4E10 epitopes. FC-3 epitope seems to be

conformational and encompass a region containing FC-2, 2F5 and 4E10 epitopes probably MPER.

The three mAbs interfered with the gp41 conformational changes by blocking the formation of the fusion active gp41 six helix bundle as demonstrated by two different assay systems (cell-cell fusion test and ELISA test). The ability of other anti-gp41 specific mAbs as 2F5 or 4E10 to block fusion was observed at a range of concentration about 100 µg/ml by co-culturing the MOLT/CCR5 cells with the NL4-3/BaL isolates and with CD4 T cells [69]. Previously, Massanella *et al.* produced four mAbs in mice after immunization with recombinant soluble gp41 produced in *E. coli*. These four mAbs bind to the recombinant soluble gp41 and recognize the native envelope glycoprotein gp160. All four purified mAbs could inhibit HIV-1 Env-mediated membrane fusion (syncytium formation) by 40%–60% at 10 µg/mL but with low neutralizing activity against common HIV-1 strains.

In this work, a cell line which expressed a conformational gp41 in a cell-membrane context to induce potent neutralizing antibodies has been used as immunogen. The use of this cell line allow to us to generate highly potent antibodies with an high specificity for the pre-fusion complex. The three antibodies have the capacity to strongly interfere with HR1/HR2 complex formation and to inhibit very efficiently the HIV-1 infectious process. A better activity of FC-2 and FC-3 were observed on HR1/HR2 complexes containing heterologous regions than those contained in the HEK 293-gp41^{MSD} cell line used for immunization. The capacity of these antibodies to mediate ADCC or ADCVI against infected cells has not yet been studied. These mAbs will first be humanized in order to prevent HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) immune responses both in monkeys and in humans. Such type of antibodies reacting specifically with the fusion complex could be used, alone or associated, as therapy to block the entry of HIV-1 after a recent viral exposition or to reduce, after systemic administration, the viral burden and the massive CD4 depletion in HIV-1 reservoirs as the intestine. The capacity of these antibodies to block the fusion process could be also tested on T20 resistant strains.

It appears that the fusion complex epitope when expressed in a cell-membrane context is strongly immunogenic and is able to elicit neutralizing antibody. The proximity between the fusion complex and the lipid bilayer of the transfected cell line is probably involved in the correct assembly and exposure to the surface of the cells. This study re-explores and demonstrate the great interest of gp41 as immunogen to induce cross-clade neutralizing antibodies. Approaches based on conformational HR1/HR2 complexes should be further explore to evaluate their ability to induce protective immunity.

Acknowledgements

This study was supported by the region Rhône-Alpes, the French agencies ANRS and Sidaction, and by the Europrise European HIV enterprise consortium. The authors would like to thank Dr N. Vincent for her initial participation in the project.

Conflicts of interest

None declared.

References

1. Walker BD, Ahmed R, Plotkin S. **Moving ahead an HIV vaccine: use both arms to beat HIV.** *Nat Med* 2011; **17**:1194–1195.
2. Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, Butera ST, Crotty S, Godzik A, *et al.* **A Blueprint for HIV Vaccine Discovery.** *Cell Host Microbe* 2012; **12**:396–407.
3. Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, *et al.* **Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies.** *Nature* 2011; **477**:466–470.
4. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. **Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications.** *J Virol* 2007; **81**:10209–10219.
5. Walker LM, Burton DR. **Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions.** *Curr Opin Immunol* 2010; **22**:358–366.
6. Harrison SC. **Viral membrane fusion.** *Nat Struct Mol Biol* 2008; **15**:690–698.
7. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** *Nature* 1984; **312**:763–767.
8. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Herceud T, *et al.* **T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.** *Nature* 1984; **312**:767–768.
9. Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, *et al.* **Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core.** *Science* 2005; **310**:1025–1028.
10. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.** *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:657–700.
11. Moore JP, Trkola A, Dragic T. **Co-receptors for HIV-1 entry.** *Curr Opin Immunol* 1997; **9**:551–562.
12. Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y. **Virus membrane fusion.** *FEBS Lett* 2007; **581**:2150–2155.
13. Munoz-Barroso I, Durell S, Sakaguchi K, Appella E, Blumenthal R. **Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41.** *J Cell Biol* 1998; **140**:315–323.
14. Furuta RA, Wild CT, Weng Y, Weiss CD. **Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41.** *Nat Struct Biol* 1998; **5**:276–279.
15. Matthews T, Salgo M, Greenberg M, Chung J, DeMasi R, Bolognesi D. **Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes.** *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**:215–225.
16. Caffrey M, Cai M, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield PT, Covell DG, *et al.* **Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41.** *EMBO J* 1998; **17**:4572–4584.
17. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. **Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.** *Cell* 1997; **89**:263–273.
18. Lu M, Blacklow SC, Kim PS. **A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein.** *Nat Struct Biol* 1995; **2**:1075–1082.
19. Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W. **Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions.** *PLoS Pathog* 2010; **6**:e1000880.

20. Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 2000; 151:413–423.
21. Weissenhorn W, Calder LJ, Dessen A, Laue T, Skehel JJ, Wiley DC. Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:6065–6069.
22. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997; 387:426–430.
23. de Rosny E, Vassell R, Jiang S, Kunert R, Weiss CD. Binding of the 2F5 monoclonal antibody to native and fusion-intermediate forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for fusion-inducing conformational changes. *J Virol* 2004; 78:2627–2631.
24. Dimitrov AS, Jacobs A, Finnegan CM, Stiegler G, Katinger H, Blumenthal R. Exposure of the membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Biochemistry* 2007; 46:1398–1401.
25. Frey C, Peng H, Rits-Volloch S, Morelli M, Cheng Y, Chen B. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:3739–3744.
26. Barbato G, Bianchi E, Ingallinella P, Hurni WH, Miller MD, Ciliberto G, et al. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J Mol Biol* 2003; 330:1101–1115.
27. Brunel FM, Zwick MB, Cardoso RM, Nelson JD, Wilson IA, Burton DR, Dawson PE. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J Virol* 2006; 80:1680–1687.
28. Cardoso RM, Brunel FM, Ferguson S, Zwick M, Burton DR, Dawson PE, Wilson IA. Structural basis of enhanced binding of extended and helically constrained peptide epitopes of the broadly neutralizing HIV-1 antibody 4E10. *J Mol Biol* 2007; 365:1533–1544.
29. Law M, Cardoso RM, Wilson IA, Burton DR. Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J Virol* 2007; 81:4272–4285.
30. McGaughey GB, Citron M, Danzeisen RC, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, et al. HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry* 2003; 42:3214–3223.
31. Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67:6642–6647.
32. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spellenhauer C, Saphire EO, Binley JM, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* 2001; 75:10892–10905.
33. Chen YH, Bock G, Vornhagen R, Steindl F, Katinger H, Dierich MP. HIV-1 gp41 binding proteins and antibodies to gp41 could inhibit enhancement of human Raji cell MHC class I and II expression by gp41. *Mol Immunol* 1994; 31:977–982.
34. Morris L, Chen X, Alam M, Tomaras G, Zhang R, Marshall DJ, et al. Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting. *PLoS One* 2011; 6:e23532.
35. Montero M, Gulzar N, Klaric KA, Donald JE, Lepik C, Wu S, et al. Neutralizing Epitopes in the Membrane-Proximal External Region of HIV-1 gp41 Are Influenced by the Transmembrane Domain and the Plasma Membrane. *J Virol* 2012; 86:2930–2941.
36. Vincent N, Kone A, Chanut B, Lucht F, Genin C, Malvoisin E. Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* 2008; 22:2075–2085.
37. Jiang S, Lin K, Lu M. A conformation-specific monoclonal antibody reacting with fusion-active gp41 from the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 1998; 72:10213–10217.
38. Bianchi E, Finotto M, Ingallinella P, Hrin R, Carella AV, Hou XS, et al. Covalent stabilization of coiled coils of the HIV gp41 N region yields extremely potent and broad inhibitors of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:12903–12908.
39. Nelson JD, Kinkead H, Brunel FM, Leaman D, Jensen R, Louis JM, et al. Antibody elicited against the gp41 N-heptad repeat (NHR) coiled-coil can neutralize HIV-1 with modest potency but non-neutralizing antibodies also bind to NHR mimetics. *Virology* 2008; 377:170–183.
40. Louis JM, Nesheiwat I, Chang L, Clore GM, Bewley CA. Covalent trimers of the internal N-terminal trimeric coiled-coil of gp41 and antibodies directed against them are potent inhibitors of HIV envelope-mediated cell fusion. *J Biol Chem* 2003; 278:20278–20285.
41. Corti D, Langedijk JP, Hinz A, Seaman MS, Vanzetta F, Fernandez-Rodriguez BM, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One* 2005; 5:e8805.
42. Sabin C, Corti D, Buzon V, Seaman MS, Lutje Hulsik D, Hinz A, et al. Crystal structure and size-dependent neutralization properties of HK20, a human monoclonal antibody binding to the highly conserved heptad repeat 1 of gp41. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1001195.
43. Bianchi E, Joyce JG, Miller MD, Finnefrock AC, Liang X, Finotto M, et al. Vaccination with peptide mimetics of the gp41 prehairpin fusion intermediate yields neutralizing antisera against HIV-1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:10655–10660.
44. de Rosny E, Vassell R, Wingfield PT, Wild CT, Weiss CD. Peptides corresponding to the heptad repeat motifs in the transmembrane protein (gp41) of human immunodeficiency virus type 1 elicit antibodies to receptor-activated conformations of the envelope glycoprotein. *J Virol* 2001; 75:8859–8863.
45. Golding H, Zaitseva M, de Rosny E, King LR, Manischewitz J, Sidorov I, et al. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol* 2002; 76:6780–6790.
46. Gustchina E, Li M, Louis JM, Anderson DE, Lloyd J, Frisch C, et al. Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1001182.
47. Trebak M, Chong JM, Herlyn D, Speicher DW. Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology. *J Immunol Methods* 1999; 230:59–70.
48. 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.
49. Holl V, Peressin M, Schmidt S, Decoville T, Zolla-Pazner S, Aubertin AM, Moog C. Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. *Blood* 2006; 107:4466–4474.
50. Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, Hill CP, Kay MS. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:16828–16833.
51. Pantophlet R, Burton DR. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:739–769.
52. Greenberg ML, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:333–340.
53. Moyle G. Stopping HIV fusion with enfuvirtide: the first step to extracellular HAART. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:213–217.
54. McGaughey GB, Barbato G, Bianchi E, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, et al. Progress towards the development of a HIV-1 gp41-directed vaccine. *Curr HIV Res* 2004; 2:193–204.
55. Poveda E, Briz V, Soriano V. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev* 2005; 7:139–147.
56. Xu JY, Gorny MK, Palker T, Karwowska S, Zolla-Pazner S. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol* 1991; 65:4832–4838.
57. Pietzsch J, Scheid JF, Mouquet H, Seaman MS, Broder CC, Nussenzeig MC. Anti-gp41 antibodies cloned from HIV-infected patients with broadly neutralizing serologic activity. *J Virol* 2010; 84:5032–5042.
58. Gauduin MC, Parren PW, Weir R, Barbas CF, Burton DR, Koup

- RA. Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat Med* 1997; 3:1389–1393.
59. Xu W, Hofmann-Lehmann R, McClure HM, Ruprecht RM. Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV. *Vaccine* 2002; 20:1956–1960.
60. Chen CH, Greenberg ML, Bolognesi DP, Matthews TJ. Monoclonal antibodies that bind to the core of fusion-active glycoprotein 41. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:2037–2041.
61. Diomedé L, Nyoka S, Pastori C, Scotti L, Zambon A, Sherman G, *et al.* Passively transmitted gp41 antibodies in babies born from subtype C HIV-1 seropositive women: correlation between fine specificity and protection. *J Virol* 2012.
62. Dimitrov AS, Louis JM, Bewley CA, Clore GM, Blumenthal R. Conformational changes in HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and inactivation. *Biochemistry* 2005; 44:12471–12479.
63. Hartono YD, Lazim R, Yip YM, Zhang D. Computational study of bindings of HK20 Fab and D5 Fab to HIV-1 gp41. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22:1695–1700.
64. Jin L, Pan C, Qi Z, Zhou ZH, Jiang S. Fab crystallization and preliminary X-ray analysis of NC-1, an anti-HIV-1 antibody that recognizes the six-helix bundle core of gp41. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2010; 66:854–857.
65. Lüftig MA, Mattu M, Di Giovine P, Geleziunas R, Hrin R, Barbato G, *et al.* Structural basis for HIV-1 neutralization by a gp41 fusion intermediate-directed antibody. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13:740–747.
66. Miller MD, Geleziunas R, Bianchi E, Lennard S, Hrin R, Zhang H, *et al.* A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:14759–14764.
67. Bellamy-McIntyre AK, Lay CS, Baar S, Maerz AL, Talbo GH, Drummer HE, Pournourios P. Functional links between the fusion peptide-proximal polar segment and membrane-proximal region of human immunodeficiency virus gp41 in distinct phases of membrane fusion. *J Biol Chem* 2007; 282:23104–23116.
68. Fiebig U, Schmolke M, Eschricht M, Kurth R, Denner J. Mode of interaction between the HIV-1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 and its epitope. *AIDS* 2009; 23:887–895.
69. Massanella M, Puigdomenech I, Cabrera C, Fernandez-Figueras MT, Aucher A, Gábelet G, *et al.* Antiggp41 antibodies fail to block early events of virological synapses but inhibit HIV spread between T cells. *AIDS* 2009; 23:183–188.