

Université de Montréal

**Étude des immunoglobulines G dirigées contre l'enveloppe
du VIH-1 dans des spécimens vaginaux et sanguins de
travailleuses du sexe béninoises**

par

Laurie-Anne Batrville

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès science (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Août 2014

© Laurie-Anne Batrville, 2014

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude des immunoglobulines G dirigées contre l'enveloppe du VIH-1
dans des spécimens vaginaux et sanguins de travailleuses du sexe
béninoises

présenté par :

Laurie-Anne Batrville

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr John Stagg, Ph.D. Président

Dr Michel Roger, M.D. Ph.D. Directeur de recherche

Dr Andrés Finzi, Ph.D. Co-Directeur de recherche

Dr Hugo Soudeyns, Ph.D. Membre du jury

Résumé

Objectif: La caractérisation des facteurs immunitaires associés à la protection contre l'infection au VIH est cruciale pour le développement de stratégies de prévention. Cette étude évalue les IgGs dirigées contre l'enveloppe du VIH-1 dans le sérum et les liquides cervicovaginaux (LCV) de travailleuses du sexe béninoises.

Méthode : Notre étude porte sur 23 travailleuses du sexe séropositives (TS+) et 20 travailleuses du sexe séronégatives (TS-). Le potentiel de neutralisation a été évalué par un essai de neutralisation. La détection d'IgGs a été effectuée par un ELISA sur base cellulaire. La capacité d'induire une réponse ADCC a été évaluée par l'élimination de cellules cibles recouvertes de gp120 par le mécanisme d'ADCC.

Résultats : Malgré que nous n'ayons pas détecté d'IgG dirigées contre l'enveloppe du VIH-1, ni d'activité de neutralisation ou d'élimination de cellules cibles par ADCC chez les TS-, nous avons facilement détecté ces activités de neutralisation et d'élimination de cellules cibles par ADCC chez les TS+ dans le sérum et les LCV qui reconnaissent mieux la forme de l'enveloppe liée à CD4. Ces IgGs pourraient être impliquées dans l'élimination par ADCC des cellules cibles présentant les glycoprotéines de l'enveloppe à leur surface, et ce à la muqueuse vaginale, le premier site de transmission virale.

Conclusion : Ces résultats permettent pour la première fois de montrer la conformation de l'enveloppe préférentiellement reconnue par les IgGs présentes au site de transmission par voie sexuelle.

Mots-clés : VIH-1, anticorps, neutralisation, ADCC, sang, muqueuse vaginale, travailleuses du sexe

Abstract

Objective: Characterization of the immune correlates of protection against HIV infection is crucial for the development of preventive strategies. This study examined HIV-1 envelope glycoproteins (Env) specific IgG in systemic and mucosal compartments of female Beninese commercial sex workers (CSWs).

Design: 23 HIV-1-positive and 20 highly-exposed HIV-1-seronegative (HESN) CSWs were studied.

Methods: HIV-1-Env specific IgG detection in sera and cervico-vaginal lavages (CVLs) from the study population was done by cell-based ELISA. The HIV neutralizing activity was evaluated with a neutralization assay. HIV-1 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) response of the cohort was measured with a FACS-based assay evaluating the ADCC-mediated elimination of gp120-coated target cells.

Results: No anti-HIV-1-Env-specific IgG, neutralizing or ADCC activities were detected in samples from HESN CSWs. Samples from HIV-1-infected CSWs presented ADCC activity in both sera and CVLs. Anti-Env IgG from sera and CVLs from HIV-1-infected CSWs preferentially recognized the Env in its CD4-bound conformation.

Conclusion: These results demonstrate for the first time that HIV-1-infected CSWs have ADCC-mediating IgG that preferentially recognize Env in its CD4-bound conformation at the mucosal site.

Keywords : HIV-1, antibodies, neutralization, ADCC, blood, genital mucosa, sex workers.

Table des matières

Résumé	i
Table des matières	ii
Liste des figures	iv
Liste des abbréviations	v
Remerciements	ix
Introduction	1
1. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)	1
1.1 Incidence du SIDA	1
1.2. Classification du virus	2
1.2.1. Répartition géographique des différents clades	3
1.3. La structure du virus	4
1.4. L'organisation génomique du VIH-1	5
1.5. Le cycle réplicatif du VIH-1	6
1.6. La pathogenèse du VIH-1	12
1.7. Le rôle des protéines accessoires et leurs antagonistes dans la réplication et la pathogenèse virale.....	14
1.7.1. Vif.....	14
1.7.2. Vpr	15
1.7.3. Vpu	15
1.7.4. Nef	16
2. Le VIH et les femmes	16
2.1. Le tractus génital féminin	17
2.2. La muqueuse génitale féminine : Une barrière naturelle	18
2.2.1. Barrière Physique.....	19
2.2.2. Barrière Chimique	20
2.2.3. Barrière cellulaire	21
2.3. Immunité adaptative au VIH	23
2.3.1. La réponse humorale au VIH à la muqueuse vaginale	24

2.3.2. La réponse humorale au VIH dans le compartiment systémique	25
2.3.3. Le pont entre la réponse innée et adaptative : la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).....	29
2.4. L'enveloppe du VIH et ses changements de conformation	32
3. Immunité naturelle à l'infection par le VIH-1	33
3.1. Un modèle de protection contre l'acquisition de l'infection.....	34
3.1.1. Facteurs associés à l'immunité naturelle.....	34
HYPOTHÈSES	37
OBJECTIFS	37
DESCRIPTION DE LA POPULATION BÉNINOISE À L'ÉTUDE	38
ARTICLE	40
DISCUSSION.....	58
Travailleuses du sexe séronégatives (TS-).....	58
Travailleuses du sexe séropositives (TS+)	64
Conclusion	68
Bibliographie	i
Annexe 1	xvi
Annexe 2	xxxvi

Liste des figures

Figure 1 La représentation schématique de la structure d'une particule mature du VIH-1	5
Figure 2 L'organisation génomique du VIH-1	6
Figure 3 Les étapes de l'entrée par fusion du VIH-1	8
Figure 4 Le cycle réplcatif d'une particule virale	12
Figure 5 Les sites de vulnérabilité sur l'enveloppe du VIH-1 reconnus par les anticorps neutralisants à large spectre	27
Figure 6 Les sites de vulnérabilité sur l'enveloppe du VIH-1 ciblés par les anticorps non- neutralisants en l'absence (A) ou en présence (B) de CD4	29

Liste des abréviations

A3G : APOBEC 3G

ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity/ cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

ADN: acide désoxyribonucléique

APOBEC3 : apolipo protein B mRNA editing, catalytic polypeptide-like

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNt : ARN de transfert

ARNv: ARN viral

ARV: antirétroviraux

CA: capside

CCR2b: C-C-chemokine receptor 2b

CCR3: C-C-chemokine receptor 3

CCR5: C-C-chemokine receptor 5

CD4: cluster of differentiation 4

CD4bs : CD4 binding site

CD4i: épitopes qui sont induits par le CD4

CDk9 : cyclin-dependent kinase-9

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

CPA : cellules présentatrices d'antigène

CPI : complexe de pré-intégration

CPZ : chimpanzé

CTI : complexe de transcription inverse

CTL : cellules T cytotoxiques

CXCR4: CXC-chemokine receptor 4

DC : cellules dendritiques

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

env: enveloppe

ERAD : ER-associated degradation

FCR: Formes circulaires recombinantes

FcRn : récepteur Fc néonatal

FRET : transfert d'énergie par résonance en fluorescence

gag: group-specific antigen

GALT : gut-associated lymphoid tissue

gp: glycoprotéine

HESN : hautement exposée non-infectée

HLA: human leukocyte antigen

HR1: heptad repeat 1

HR2: heptad repeat 2

IFN- γ : interferon gamma

IgA: immunoglobuline A

IgG: immunoglobuline G

IN: intégrase

LCV : lavages cervicovaginaux

LEDGF/p75 : lens epithelium-derived growth factor

LTR : long terminal repeat

MA: matrice

MIP-1 α : macrophages inflammatory protein 1alpha

MIP-1 β : macrophages inflammatory protein 1beta

MLV: murine leukemia virus/ virus de la leucémie murine

MPER: région membranaire externe proximale

NC: nucléocapside

nef: negative factor

NK: natural killer

NLR : nod-like receptor

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

pb : paires de bases

pDC : cellules dendritiques plamacytoïdes

pH : potentiel d'hydrogène

pol: polymérase

PR: protéase

PRR : pattern recognition receptor

PS: phosphatidylsérine

RER : réticulum endoplasmique rugueux

rev: regulator of expression of virion proteins

RNaseH : ribonucléase H

rre: rev responsive element

RT: transcriptase inverse

SAMHD1: sterile alpha motif and HD domain 1

SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise

SIgA : IgA sécrétoire

SLPI: secretory leukoprotease inhibitor

SM : sooty mangabey / mangabey cenon

tar : transactivation response region

tat: transactivateur de la transcription

TCL: T-cell line

TGF: tractus génital féminin

TLR : toll-like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

Trappin-2: transglutaminase substrate and wap domain containing protein

Tregs: cellules T régulatrices

TS: travailleuses du sexe

TS-: travailleuses du sexe séronégatives

TS+: travailleuses du sexe séropositives

TSB: travailleuses du sexe béninoises

vif: virus infectivity factor

VIH-1: virus de l'immunodéficience humaine de type 1

VIH-2: virus de l'immunodéficience humaine de type 2

VIS: virus de l'immunodéficience simienne

vpr: viral protein R

vpu: viral protein U

vpx: viral protein X

*Je dédie mon mémoire à toutes les populations
vulnérables et marginalisées atteintes du VIH
qui n'ont pas accès aux traitements
antirétroviraux.*

Remerciements

J'aimerais exprimer ma gratitude aux membres de l'équipe du Bénin ainsi qu'aux participantes à l'étude qui ont fourni leurs échantillons sanguins et leurs échantillons de la muqueuse génitale, sans qui l'étude n'aurait pu avoir lieu.

J'aimerais également remercier ma famille pour leur amour pur, simple et inconditionnel. Un remerciement spécial à Gertha, Audrigue, Robens et Nathalie, *lanmou nou ki san fwontyè se richès mwen*.

J'aimerais ensuite remercier le Dr. Michel Roger et le Dr. Andrés Finzi de m'avoir permis de prendre part à l'avancement de leurs projets de recherches les plus intéressants. Michel, je te remercie pour ta supervision enthousiaste, ton aide, ton soutien quotidien qu'il soit lointain ou proche, il est toujours présent, mais je te remercie surtout pour la chance et les moyens que tu m'as donnés pour réaliser mes projets de recherche. Andrés, tu as non seulement contribué de façon significative à mon épanouissement scientifique en tant que chercheuse, tu m'as aussi enseigné avec un grand dynamisme à me dépasser au-delà de mes limites perçues afin d'en créer des nouvelles pour ensuite les surpasser de nouveau. Dre Johanne Poudrier j'ai toujours eu une grande estime pour ton expertise et tes conseils.

J'aimerais également remercier tous les membres du laboratoire de Michel. Merci à Karine

Beauchemin, Josiane Chagnon-Choquet, Marie-Claude Faucher, Julie Gauvin, Catherine

Sabourin-Poirier et Valérie Thibodeau, malgré ma présence irrégulière au labo vous vous êtes toujours assurées de me faire sentir chez moi et de m'apporter tout le soutien dont j'avais besoin. J'aimerais également remercier tous les membres du laboratoire de l'équipe d'Andrés. Merci à Nirmin Alsaïfi, Mathieu Coutu, Olfa Debbeche, Anik Désormeaux, Halima Medjahed, Jonathan Richard et Maxime Veillette, j'ai bien apprécié l'entraide au sein de notre groupe ainsi que le métissage de l'engagement scientifique et intellectuel de chacun d'entre vous dans mes projets. Cela a vraiment renforcé notre esprit d'équipe de recherche, et pour cela et bien plus encore « Larry » vous remercie! J'aimerais remercier spécifiquement Maxime Veillette et Jonathan Richard pour leurs commentaires, leurs suggestions et leur aide sur ce mémoire. J'apprécie aussi la complicité et la camaraderie que j'ai pu développer avec les membres de mes deux laboratoires au fil du temps.

Je tiens également à saluer l'équipe de Saint-Luc qui fait partie de l'axe infection, immunité, inflammation et insulte tissulaire et qui sont maintenant au neuvième étage de la tour Viger du nouveau CRCHUM. Sarah Tran, je te remercie pour ton humour et ta joie de vivre. Cette grande équipe comprend aussi tous les membres des équipes de Dre. Shoukry, de Dre. Ancuta, de Dr. Kaufmann et de Dre. Tremblay, avec qui j'ai passée de nombreuses heures au NC3 ou au NC2. Ce fut un privilège et un réel plaisir vous côtoyer, car vous êtes des petits porteurs de bonheurs, de soutien moral et d'encouragements quotidiennement.

Introduction

1. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

1.1 Incidence du SIDA

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (1, 2). L'infection par le VIH de type 1 (VIH-1) est l'un des plus grands défis épidémiologiques auquel le monde entier est confronté depuis plus de trente ans. Le VIH-1 cause une infection virale persistante et progressive qui mène à la détérioration du système immunitaire. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, depuis le premier cas rapporté de SIDA en juin 1981, près de 39 millions de personnes en sont mortes à travers le monde (3, 4). À l'échelle mondiale en 2013, 35 millions de personnes vivaient avec le VIH, parmi celles-ci 19 millions ne savaient pas qu'elles étaient infectés par le virus (5). Dans cette même année, il y a eu 2,1 millions nouvelles infections par rapport à 2,7 millions en 2010. En dépit de ces progrès, le nombre total de nouvelles infections demeure élevé (6, 7). Les traitements antirétroviraux (ARV) disponibles ont permis de prolonger l'espérance de vie des patients infectés par le VIH-1 en réduisant leur charge virale. Toutefois, les ARVs ne suppriment pas entièrement la réplication virale à cause des réservoirs cellulaires (8-10). Les réservoirs sont des cellules où le virus se cache, parce que le virus est intégré dans le génome de la cellule mais la cellule ne se multiplie pas (11). En d'autres mots, les ARVs ne permettent pas de guérison. En 2013, les individus en Afrique subsaharienne vivant avec le VIH représentaient presque 70% du fardeau mondial du VIH (12). De plus, à l'échelle mondiale seulement 37% des personnes qui avaient besoin du traitement en ont bénéficié en 2013 (12).

Bref, il y a un grand besoin pour de nouvelles approches thérapeutiques et préventives contre le VIH-1.

1.2. Classification du virus

Le SIDA peut être causé par deux virus de l'immunodéficience humaine différents, soit le VIH-1 et le VIH de type 2 (VIH-2). Ces virus appartiennent à la famille des *Retroviridae*. Ils portent leur matériel génétique sous forme d'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire diploïde, à polarité positive (13). Lorsque les virus membres de cette famille pénètrent une cellule, ils ont la capacité de faire une transcription inverse, c'est-à-dire de transcrire l'ARN simple brin en acide désoxyribonucléique (ADN) double brin à l'aide d'une transcriptase inverse (TI) (14).

La famille des rétrovirus qui infectent les vertébrés comprend sept genres différents qui se divisent en deux catégories, rétrovirus simples ou complexes, selon leur organisation génomique. Le VIH-1, le VIH-2 (15) et le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) sont des rétrovirus complexes qui appartiennent au genre des *lentivirinae* (16). Tous les rétrovirus sont constitués de trois gènes principaux: *gag* (« *group-specific-antigen* »), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe). Par contre, les rétrovirus complexes tels que le VIH-1 et VIH-2 contiennent en plus des gènes supplémentaires codant pour des protéines accessoires et régulatrices (14).

L'épidémie du VIH a surgi suite à une infection zoonotique avec le VIS qui infecte naturellement certains primates non humains (17, 18). Le VIH-1 est phylogénétiquement plus près du VIS, dont le chimpanzé (VIS_{cpz}) est l'hôte naturel (19). Le génome du VIS_{cpz} contient

le gène *vpu* qui est également présent dans le VIH-1. Quant au VIH-2, il est phylogénétiquement plus près du VIS, dont le macaque Mangabey Cenon (VIS_{smm}) est l'hôte naturel, chez qui l'infection par le SIV est non pathogénique (20, 21).

Au sein du VIH-1, il y a quatre groupes d'isolats qui diffèrent sur des bases d'analyses phylogénétiques : M (« *main* »), N (non-M, non-O), O (« *outlier* »), P (« *pending* »). Le groupe M est responsable de la pandémie actuelle du SIDA et présente un très haut niveau de diversité génétique virale dans le monde entier (22, 23). Il représente plus de 90 % des cas d'infections au VIH-1 (22, 24).

Le groupe M contient lui-même 9 sous-types ou clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) (25, 26). Le sous-type C représentait 50 % de toutes les infections dans le monde en 2004. Les sous-types A, B, D et G représentaient respectivement 12 %, 10 %, 3 % et 6 %. Les sous-types F, H, J et K ont représenté 0,94 % des infections en 2004 (27). Les sous-types peuvent se recombiner entre eux et former des formes circulaires recombinantes (FCR) telles que AG ou AB (14, 26).

1.2.1. Répartition géographique des différents clades

Le clade A prédomine en Afrique occidentale et en Afrique centrale. Le clade B domine en Amérique et en Europe. Le clade C prédomine dans le sud du continent africain. Le clade D est limité à l'est de l'Afrique, l'Afrique centrale et quelques cas sporadiques ont été rapportés en Afrique de l'ouest (27). Le clade F a été signalé surtout en Amérique du sud et en Europe de l'Est. Le clade G est présent en Afrique de l'Est et en Europe. Le clade H, quant à

lui, se retrouve en Afrique centrale. Le clade J a été rapporté en Amérique et le clade K a été identifié au Congo et au Cameroun. Au Bénin, c'est le CRF02_AG qui domine (28).

1.3. La structure du virus

La représentation schématique de la structure d'une particule mature du VIH-1 est illustrée à la figure 1. Le VIH est constitué d'une enveloppe virale composée d'une bicouche lipidique sur laquelle on retrouve des spicules de protéines d'enveloppe. La protéine d'enveloppe (Env) est synthétisée sous forme de précurseur de glycoprotéine (gp), soit la gp160. La gp160 est clivée par une enzyme cellulaire afin de créer une sous-unité extracellulaire (gp120) et une sous-unité transmembranaire (gp41). La gp120 est composée de cinq régions variables (V1-V5) et cinq régions conservées (C1-C5). Ces deux gp forment un complexe hétérotrimérique et sont associées de façon non covalente. La surface interne de l'enveloppe est délimitée par la protéine de matrice (MA) de 17 000 daltons (p17) (13). L'enveloppe virale entoure la protéine de capsid (CA) de 24 000 daltons (p24) et s'assemble pour former une structure icosaédrique. À l'intérieur de la capsid se trouve la nucléocapsid (NC) de 7 000 daltons (p7). La nucléocapsid est associée au génome du virus, soit deux molécules d'ARN monocaténaire et plusieurs copies de la TI et de l'intégrase (IN) qui y sont attachées (13).

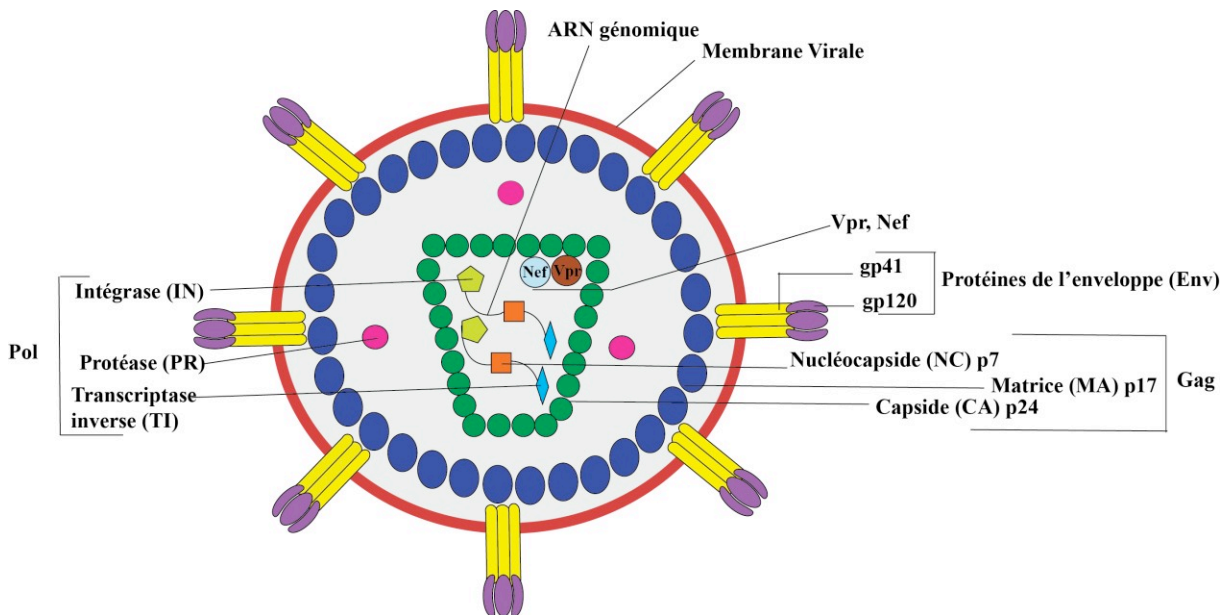


Figure 1 La représentation schématique de la structure d'une particule mature du VIH-1

1.4. L'organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1, un rétrovirus complexe, contient trois gènes standards : *gag*, *pol* et *env*. Le gène *gag* code pour des protéines structurales, soit p24, p17 et p7 (Figure 2). Le gène *pol* code pour des protéines virales impliquées dans des fonctions enzymatiques, soit la TI, l'IN et la protéase (PR) (Figure 2). Le gène *env* code pour des protéines virales impliquées dans l'enveloppe du virus, soit les glycoprotéines d'enveloppe, la gp120 et la gp41 (13, 29) (Figure 2). En plus des trois gènes standards, le VIH-1 contient six cadres de lectures supplémentaires qui codent pour des gènes importants dans la réplication virale : *tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpr* et *vpu* (Figure 2) (16). L'ensemble du génome, encadré aux extrémités 5' et 3' par des séquences « *long terminal repeats* » (LTR), est d'environ 9 000 paires de base (pb). Le gène *tat* code pour la protéine de transactivation de la transcription Tat et le gène *rev* pour la protéine régulatrice Rev. Quant au gène *nef*, il code pour le facteur négatif, Nef. Le gène *vif* code pour la protéine d'infectivité virale, Vif. Le gène *vpr* code pour la protéine virale R, Vpr. Le gène *vpu* code pour la protéine virale U, Vpu (30, 31).

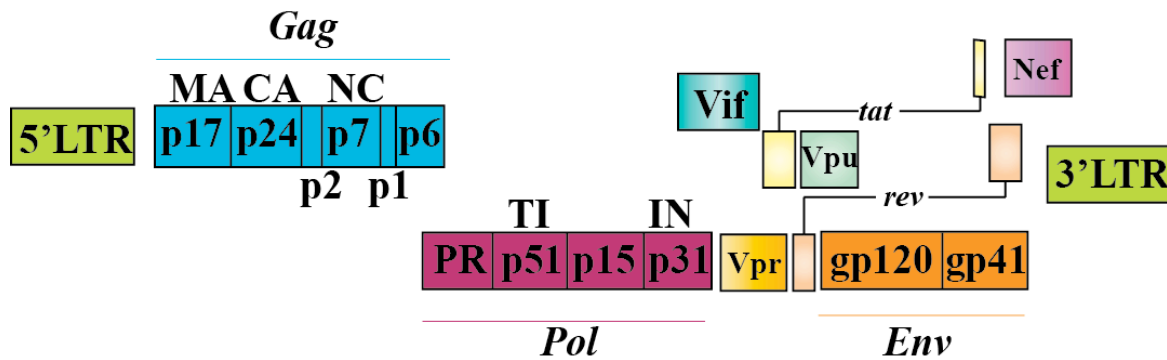


Figure 2 L'organisation génomique du VIH-1

1.5. Le cycle réplcatif du VIH-1

Les étapes du cycle réplcatif d'une particule virale infectieuse sont illustrées à la Figure 4. Les étapes sont : l'attachement, l'entrée par fusion, la décapsidation, la transcription inverse, l'import nucléaire, l'intégration, la transcription, l'exportation des ARNm, la production des particules virales, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation du virus.

L'entrée du virus est initiée par l'attachement de la gp120 au récepteur CD4 (« cluster of differentiation 4 »). Cette interaction avec CD4 déclenche un changement conformationnel dans la gp120 qui augmente l'exposition de la région variable V3. Celle-ci a une forte affinité pour les corécepteurs du virus, qui sont des récepteurs de chimiokines CC de type 5 (CCR5) ou/et CXC de type 4 (CXCR4). Le tropisme pour les corécepteurs du virus dépend donc de la région variable V3 de la gp120. Les souches virales qui lient le corécepteur CCR5 sont dites « R5 ». Celles qui vont s'attacher au corécepteur CXCR4 sont dites « X4 ». Il y a aussi des virus à double tropisme dits « R5X4 » qui peuvent lier les deux corécepteurs. La transmission du virus à travers les muqueuses est établie généralement par un virus fondateur qui utilise plutôt le CCR5 que le CXCR4 (32, 33). La liaison de la V3 au corécepteur entraîne

un changement de conformation dans la gp41, ce qui permet la formation d'une structure à six hélices (34). Cette structure permet le rapprochement de la membrane virale et de la membrane plasmique cellulaire, ce qui entraîne la fusion des membranes et la relâche de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule (16). Les étapes de l'entrée par fusion du VIH sont présentées à la Figure 3.

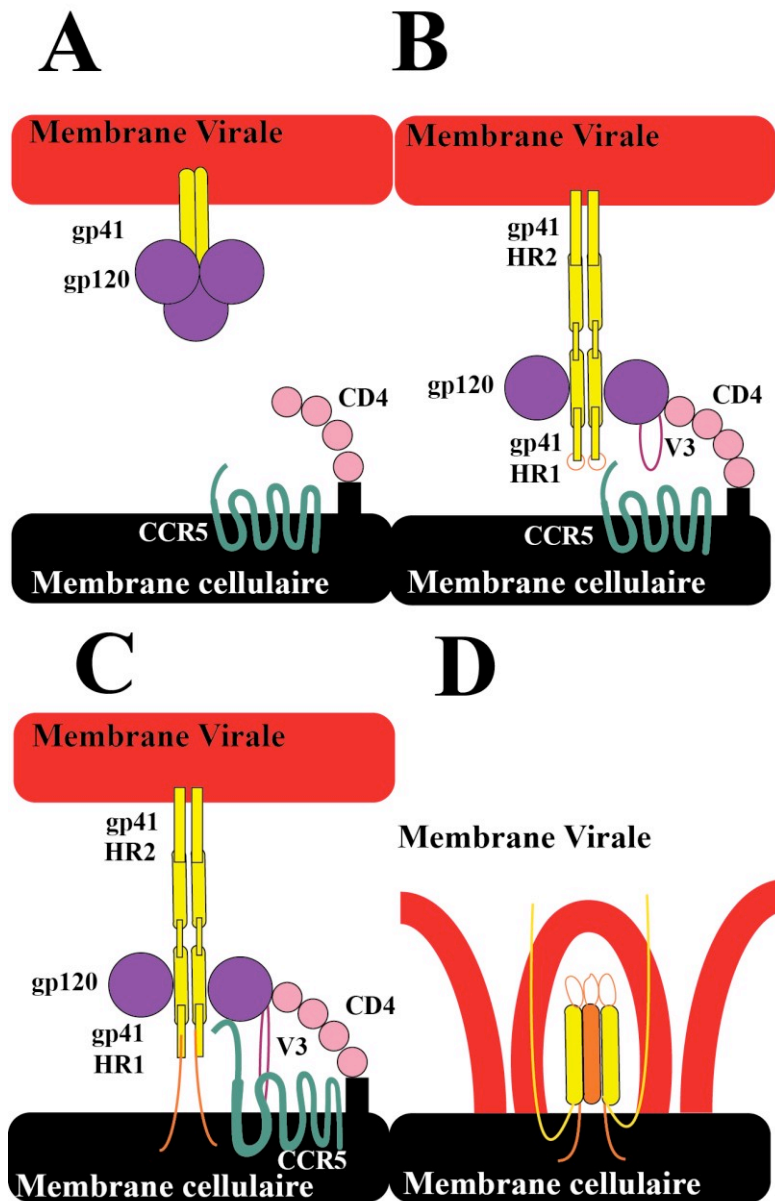


Figure 3 Les étapes de l'entrée par fusion du VIH-1

A) La gp120 se lie au récepteur CD4. B) Ceci suscite des changements conformationnels dans la gp120 qui favorise l'interaction avec l'un des corécepteurs, soit le CCR5 ou le CXCR4. C) La liaison de CD4 à la gp120 entraîne des changements de conformation au sein des protéines de l'enveloppe du VIH-1. La liaison à CD4 induit aussi des changements de conformation dans la gp41 qui expose HR1 (« *heptad repeat 1*») et HR2 (« *heptad repeat 2* ») de la gp41. Ces changements se traduisent par la formation d'un intermédiaire en forme d'épingle à cheveux par la sous-unité gp41. La liaison du corécepteur à la région variable V3 permet l'insertion du peptide fusion dans la membrane cellulaire. D) Ce changement de conformation induit la formation d'une structure à six hélices composées de HR1 et HR2 permettant la fusion de la membrane virale et cellulaire.

La prochaine étape est la décapsidation. Elle permet la formation du complexe de transcription inverse (CTI). Le CTI comprend deux brins d'ARN viral (ARNv), un ARN de transfert (ARNt) ainsi que des protéines virales telles que PR, TI, IN, Vpr, NC et MA (35).

Lors de la transcription inverse, l'ARNv est rétrotranscrit en ADN double brin. Cette étape est initiée à l'intérieur des particules virales avant l'entrée et ce processus est ensuite complété dans le cytoplasme de la cellule (36).

L'étape suivante est l'import nucléaire, où le CTI est transporté vers le noyau par les microtubules. Durant ce transport, le CTI se transforme en complexe de pré-intégration (CPI) (35). Puis, l'ADN double brin qui peut servir de substrat pour l'intégration est transporté dans le noyau à travers les pores nucléaires dans le CPI (37).

L'intégration dans l'ADN chromosomique de l'hôte se fait par l'intégrase. Elle enlève deux ou trois nucléotides à l'extrémité de l'ADN viral, ce qui génère un substrat pour l'intégration (38). LEDGF/p75 (« *Lens Epithelium-derived Growth factor* ») est une protéine cellulaire qui permet le ciblage et l'intégration de l'ADN viral dans des régions spécifiques du génome humain (39). Dans le noyau, l'intégrase catalyse le clivage décalé dans un site précis de l'ADN de l'hôte. L'extrémité 3' de l'ADN viral rejoint l'extrémité 5' de l'ADN cellulaire clivé. Puis, la machinerie de réparation cellulaire, avec l'aide de l'IN, complète l'intégration (40). Lorsque l'ADN viral est intégré il porte le nom de « provirus ». Celui-ci sert de substrat à l'ARN polymérase.

La prochaine étape est la transcription. La transactivation de la transcription des ADN viraux se fait par la protéine Tat à partir de la séquence LTR (« *long terminal repeats* ») (41, 42). TAR (« *trans-activation response region* »), une séquence dans l'ARNm viral, va former une structure en épingle à cheveux où Tat va se fixer et recruter deux protéines cellulaires (43), soit la cycline T1 et la kinase CDk9, qui vont permettre de phosphoryler la partie C-terminale de l'ARN polymérase II. Cela va aussi empêcher les arrêts prématurés lors de l'élongation de la chaîne, ce qui par conséquent stimulera l'élongation des transcrits viraux (44). Afin de produire l'ensemble des ARN messagers (ARNm) nécessaires pour coder pour les protéines virales, les premiers transcrits viraux subissent toute une gamme d'épissages alternatifs dans le noyau de la cellule infectée (45). La plupart des souches du VIH-1 utilisent quatre sites d'épissage 5' et huit sites d'épissage 3' pour produire plus de quarante espèces d'ARNm épissés dans la cellule infectée. Ces quarante ARNm épissés comptent plusieurs ARNm bicistroniques dont l'épissage est incomplet, qui codent pour Env et Vpu (45).

L'étape suivante est l'exportation des ARNm. Normalement, dans une cellule non infectée par le VIH, les transcrits non épissés ou partiellement épissés des gènes sont dégradés dans le noyau de la cellule. Afin d'échapper à ce mécanisme, le VIH-1 exprime des facteurs de régulation qui facilitent le transport de ces transcrits viraux à l'extérieur du noyau. Or, le virus se sert de la protéine Rev pour effectuer le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm viraux non épissés codant les protéines de structure (46, 47). Le transport a lieu lorsque Rev se lie à un site de haute affinité situé près du sommet de la structure nommée RRE (« *Rev responsive élément* ») (48, 49). C'est une structure secondaire d'ARNm (47, 50), et la séquence qui code

pour cet ARN se retrouve dans le gène *env*. La liaison de Rev à cette structure RRE facilite l'exportation des ARNm vers le cytoplasme (44).

À l'étape de la production de particules virales, l'enveloppe est synthétisée à partir de l'ARNm bicistronique Vpu/Env dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) (51). Puis, la gp160, le précurseur de l'enveloppe mature (52, 53), est transportée du RER à l'appareil de Golgi. Au Golgi, la gp160 subit un clivage protéolytique par une protéine cellulaire afin de créer la gp120 et gp41 matures (54). Ces dernières sont transportées du Golgi à la surface cellulaire pour être incorporées au sein des nouveaux virions (55). Puis, les ARNm sont traduits en protéines virales dans le cytoplasme des cellules infectées. L'enveloppe et Gag-Pol sont transportés à la membrane plasmique où les particules virales bourgeonnent (56, 57). Le précurseur Gag-Pol est clivé par la protéase virale (PR) durant ou immédiatement après la relâche de la nouvelle particule virale, ce qui génère des particules matures (40, 56). C'est ainsi que se termine le cycle répliatif du VIH.

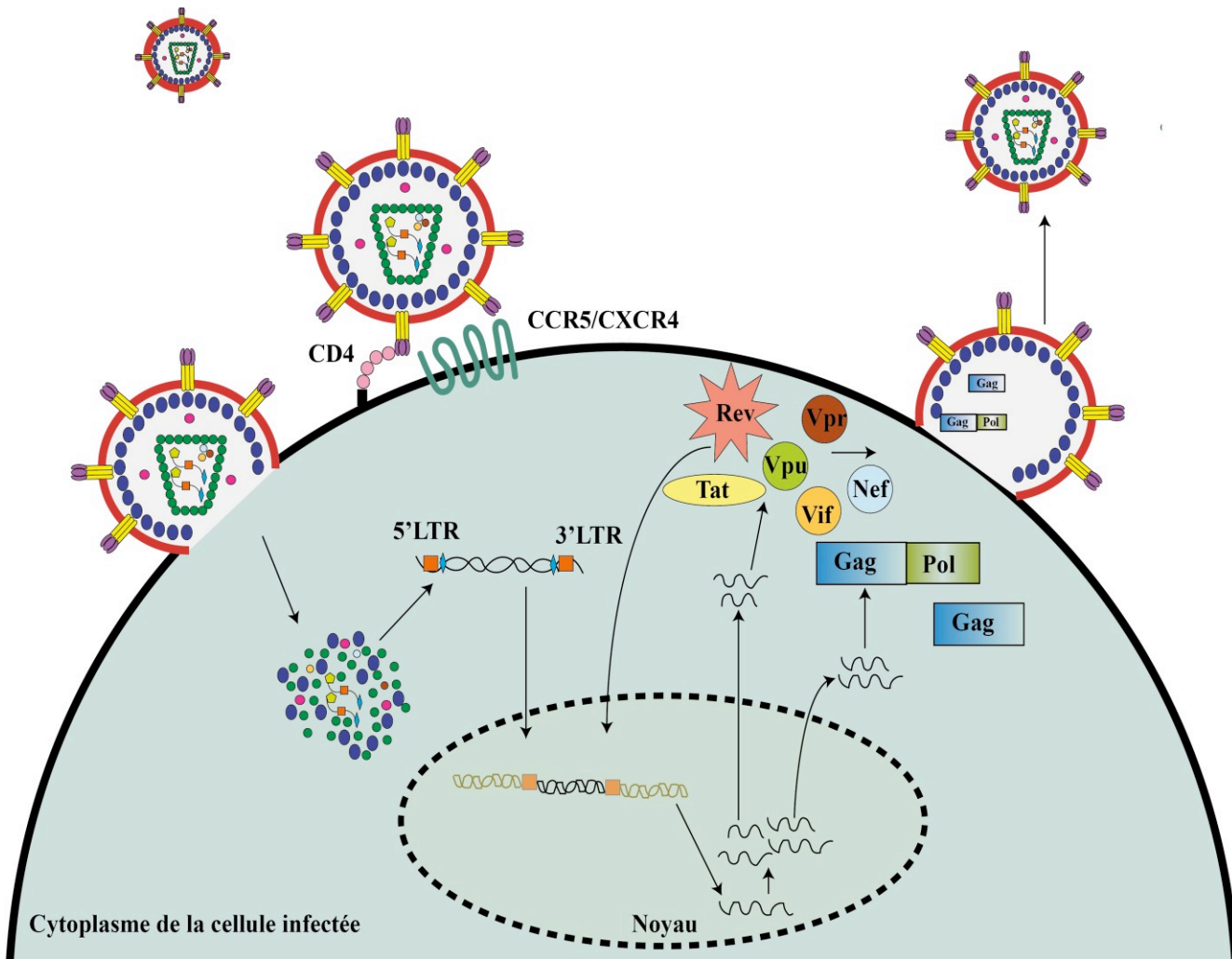


Figure 4 Le cycle répliatif d'une particule virale

1.6. La pathogénèse du VIH-1

Le VIH se transmet principalement par les relations sexuelles (58). La transmission sexuelle par les muqueuses est importante, car à l'échelle mondiale, plus de 90% de la transmission se produit à la surface des muqueuses par des contacts hétéro ou homosexuels (59-62). Les adultes entre 15-50 ans sont très touchés, car de façon générale ils sont décrits comme étant « sexuellement actifs » (63). Une infection par le VIH-1 ou le VIS est caractérisée par une période d'incubation qui est longue et qui a une lente évolution clinique (16).

Le VIH infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules de la lignée myéloïde telles que les macrophages et les cellules dendritiques (DC) (64).

Pour des raisons pratiques et éthiques, certaines études qui portent sur les premières étapes critiques de l'infection par le VIH à la muqueuse ont été effectuées avec le VIS chez le macaque rhésus, un modèle primate non humain de la transmission du VIH-1 chez les femmes. Ce modèle permet d'avoir un aperçu *in vivo* des événements qui ont lieu lors des deux premières semaines de la transmission du VIH-1 à la muqueuse vaginale (65-67). Dans ces études, on observe d'abord que l'infection initiale chez la plupart des individus est effectuée par un seul virus, un virus dit fondateur (32). Ce virus peut traverser la barrière épithéliale en quelques heures (68, 69) pour établir une petite population fondatrice de cellules infectées (70, 71). Durant la première semaine d'infection, le virus subit une expansion locale qui génère assez de virions et de cellules infectées pour permettre la dissémination et l'établissement d'une infection systémique qui se propage à travers les ganglions lymphatiques (70, 72, 73). À partir de la deuxième semaine d'infection, la réplication explose dans les tissus lymphatiques, où le virus a accès à beaucoup plus de cellules cibles susceptibles (74). La charge virale dans le sang et dans les tissus atteint un niveau maximal vers la fin de la deuxième semaine d'infection. Dans un contexte clinique chez l'humain, cette phase aiguë est caractérisée par un niveau élevé de virus dans le sang de la personne infectée, qui peut atteindre plusieurs millions de particules virales par millilitre de sang en absence de ARV, avant de chuter à des niveaux plus stables dans la quatrième semaine post-infection. À ce moment, le virus ayant migré rapidement pour se rendre aux tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal (GALT : *gut-associated lymphoid tissue*), il induit une déplétion

massive des cellules T CD4+ mémoire dans la lamina propria intestinale (75, 76). Les tissus lymphatiques infectés constituent un réservoir où le virus demeure latent. (77-79). La phase aiguë est accompagnée d'une déplétion des cellules T CD4+ dans le sang et dans le GALT ainsi que d'autres processus impliqués dans la pathologie de l'infection qui va éventuellement mener à la progression de la maladie (61). Le stade SIDA se décrit par un niveau sanguin de lymphocytes T CD4+ retrouvées dans le sang. Lorsque le niveau est en dessous de 200/ μ l, ces lymphocytes T CD4+ ne sont plus capables de remplir leur fonction adéquatement (80). Si l'individu n'est pas traité, il meurt d'une maladie opportuniste telle qu'une infection pulmonaire ou extrapulmonaire à *Mycobacterium tuberculosis*, une pneumonie récurrente et/ou un cancer du col invasif (80).

1.7. Le rôle des protéines accessoires et leurs antagonistes dans la réplication et la pathogenèse virale

Le VIH-1 utilise plusieurs stratégies pour établir une réplication virale efficace qui mène au développement de la pathogenèse. L'une de ces stratégies est l'expression de protéines accessoires.

1.7.1. Vif

La protéine « *virion infectivity factor* » (Vif) est nécessaire pour la génération de particules virales infectieuses (81). Vif augmente l'infectivité des particules virales en induisant la polyubiquitination et la dégradation protéasomale de la famille des APOBEC3 (« *apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like* ») en recrutant une E3 ubiquitine ligase. APOBEC3G (A3G) est un facteur cellulaire incorporé dans les particules

virales des cellules infectées en absence de Vif lors de la transcription inverse. A3G inhibe la réplication du VIH en catalysant la désamination des résidus cystidines dans le génome viral, ce qui induit l'incorporation des adénines (A) à la place des guanines (G) durant la synthèse du brin positif de l'ADN (82, 83). Ceci cause des hypermutations G – à – A du génome du VIH durant la transcription inverse. Le génome viral contenant des hypermutations est très instable et dans la plupart des cas il n'arrive pas à s'intégrer au génome de l'hôte (83). Dans les cas où l'intégration dans le génome de l'hôte est réussie, le provirus muté n'arrive pas à produire des protéines virales fonctionnelles. Ainsi, la production de particules virales infectieuses est avortée.

1.7.2. Vpr

Les fonctions de la protéine virale R (Vpr) ont été associées à la stimulation de l'expression de gènes par la région LTR du VIH-1, au transport du CPI au noyau durant les étapes précoces du cycle répliatif, et à l'arrêt des cellules infectées dans la phase G₂ du cycle cellulaire (84). Récemment, Vpr a été associée à une régulation positive de l'expression des ligands du récepteur activateur NKG2D pour induire la mort des cellules infectées par les cellules tueuses naturelles (« NK : *natural killer* ») (85).

1.7.3. Vpu

La protéine virale U (Vpu) se retrouve uniquement chez le VIH-1 (86, 87). Cette protéine accessoire a deux fonctions biologiques majeures. La première est la dégradation protéasomale de CD4 dans le réticulum endoplasmique (88), qui prévient la surinfection et permet une bonne relâche des particules virales (89). Vpu se sert d'un mécanisme appelé ERAD (90, 91) pour induire la dégradation de CD4. La seconde fonction de cette protéine est de contrecarrer

l'effet antiviral de la protéine cellulaire BST-2 (« *Bone marrow Stromal cell antigen 2* ») aussi connue sous le nom de tétherine (92). La régulation négative de BST-2 par Vpu représente l'un des mécanismes utilisés par le virus afin de réduire l'exposition d'épitopes de l'enveloppe du VIH qui sont reconnus par les anticorps induisant l'ADCC. Le virus réduit ainsi la quantité d'enveloppe/particules virales à la surface des cellules infectées (93).

1.7.4. Nef

La protéine *Negative Factor* (Nef) joue plusieurs rôles : elle régule négativement le CD4 (94) et les molécules du complexe majeur histocompatibilité (CMH-I) à la surface des cellules infectées. Elle augmente aussi l'infektivité du virus, et module les voies d'activation cellulaire (95). Nef recrute la machinerie d'endocytose pour séquestrer les molécules du CMH-I, les molécules HLA-A et B, mais pas HLA-C et HLA-E parce qu'elles sont reconnues par les récepteurs inhibiteurs des cellules NK (14, 96, 97). Nef interagit avec la queue cytoplasmique de la molécule de CD4 exprimée à la surface de la cellule infectée et recrute une protéine adaptatrice 1 (AP-1 : « *adaptor protein* ») pour internaliser le CD4 et l'envoyer dans les lysosomes pour la dégradation (98).

2. Le VIH et les femmes

Le VIH se transmet par trois voies : la voie sexuelle, la voie sanguine et la voie materno-fœtale. En Afrique sub-saharienne, le mode de transmission principal du VIH est par les relations hétérosexuelles, qui comptent pour 80 % des nouvelles infections à l'échelle mondiale (58). Ceci étant dit, lors de la transmission hétérosexuelle, les femmes ont une plus grande susceptibilité physiologique à l'infection par le VIH que les hommes (99). En Afrique

subsaharienne, les femmes et les filles représentent 60 % des personnes vivant avec le VIH (100). La surreprésentation des femmes parmi les personnes infectées en Afrique subsaharienne découle non seulement d'une plus grande susceptibilité physiologique à l'infection lors de la transmission hétérosexuelle homme-à-femme (99), mais également de facteurs socio-historiques (101). L'inégalité entre les sexes, quoiqu'elle ne connaisse pas de frontières, est plus prononcée en Afrique subsaharienne par rapport à l'Occident, et accentuée comme ailleurs les inégalités sexuelles, sociales et économiques (102). À ce facteur s'ajoutent le faible taux de circoncision masculine (103) et l'héritage colonial qui regroupe des pratiques médicales inadéquates et presque inexistantes pour les « indigènes » à cette époque (63, 104, 105).

2.1. Le tractus génital féminin

Chez les femmes, les infections transmises sexuellement comme le VIH infectent la muqueuse du tractus génital féminin, où la dissémination systémique peut avoir lieu (67). Il est important d'étudier le site de transmission du VIH afin de bloquer son site d'entrée.

Le tractus génital féminin (TGF) est un site immunologique unique qui protège la surface mucosale contre plusieurs pathogènes sans compromettre la pression de procréer, et tout en maintenant un équilibre sain du microbiota vaginal. Il peut être divisé en trois parties. D'abord, la partie inférieure, soit le vagin, qui est un milieu non stérile. Puis, il y a l'ectocervix, qui est colonisé par une microflore commensale. Finalement, il y a la partie supérieure, l'endocervix, les trompes de Fallope, et l'utérus, un milieu dont la stérilité varie selon la phase du cycle menstruel (106). Outre que les composantes anatomiques, le TGF

comprend aussi des composantes immunologiques qui combattent les infections. La première composante est non spécifique, mais montre une réponse rapide. Cette réponse est dite « innée » et constitue la réponse de première ligne. La réponse de première ligne contre les pathogènes est médiée par un groupe de protéines et par des phagocytes tels que les macrophages et les cellules dendritiques (107). Ces groupes de protéines et ces phagocytes reconnaissent des patterns de molécules couramment trouvés sur certains pathogènes et s'activent rapidement afin d'éliminer le pathogène(108). La seconde composante est plus lente, mais montre une réponse spécifique. Cette seconde réponse est dite : « adaptative ». Mais comparée à la réponse innée, elle génère une réponse mémoire. Cette réponse nécessite deux groupes de cellules, les lymphocytes (B et T) et les cellules présentatrices d'antigènes(108). De plus, cette réponse comporte aussi des acteurs de la réponse innée afin de tenter de combattre l'infection.

Lors de la transmission aux muqueuses, le premier obstacle que va rencontrer le virus est une barrière naturelle qui fait partie de la réponse innée.

2.2. La muqueuse génitale féminine : Une barrière naturelle

Étant donné que 80% des nouvelles infections acquises sont transmises par des relations hétérosexuelles qui ont lieu dans le tractus génital (58), il est important d'éclaircir les détails des mécanismes de protection de première ligne à la muqueuse génitale féminine contre le VIH-1. Les barrières de protection que va rencontrer un pathogène peuvent être physiques, chimiques et/ou cellulaires.

2.2.1. Barrière Physique

D'abord, les barrières physiques comprennent la peau et les membranes mucoales. Les cellules épithéliales de la muqueuse vaginale sont importantes parce qu'elles jouent un rôle essentiel dans la procréation et dans l'équilibre entre le soi et le non-soi, puisqu'elles sont pourvues de PRR « *pattern recognition receptor* » reconnaissant des PAMPS (« *pathogens-associated molecular patterns* »). Les PRRs incluent la famille des TLRs (« *Toll-like receptors* ») et des NLRs (« *NOD-like receptors* »). Lors d'une stimulation, les PRRs induisent la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens (109).

Recouvrant les cellules épithéliales de la muqueuse vaginale se trouve une couche protectrice de mucus. Le mucus est sécrété par des cryptes vaginales. Il est composé d'une famille de protéines glycosylées connues sous le nom de mucines et formant un gel épais dans lequel les pathogènes se font piéger (110). Ceci présente une barrière importante pour protéger la partie supérieure du tractus génital féminin (111). En outre, il a été démontré que le mucus humain produit par l'endocervix forme une couche dans le compartiment vaginal et entrave la mobilité du VIH-1 (112). Une composante importante du mucus cervico-vaginal est son acidité, c'est-à-dire son potentiel d'hydrogène (pH) (111). Certaines études ont démontré que la quantité d'ARN viral est plus faible dans les lavages cervicovaginaux de femmes séropositives qui ont des concentrations élevées de lactobacille vaginal (113, 114), soit la bactérie qui produit de l'acide lactique, mais également parfois du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette bactérie maintient le pH vaginal à un niveau bas (115). En somme, lors de la transmission à la muqueuse vaginale, le virus peut être confronté à des barrières physiques qui comprennent les cellules épithéliales et le mucus acide qui les recouvre.

2.2.2. Barrière Chimique

Les barrières chimiques comprennent l'acidité du TGF, les muqueuses, et des molécules antimicrobiennes. Normalement, le mucus cervico-vaginal est acidifié à un pH de 4-5 (116). Il a été montré que l'environnement acide de la muqueuse vaginale peut aussi ralentir la vitesse de diffusion du VIH par l'abolition de la charge négative à la surface du virus. En présence de sperme qui a un pH près de 8, le VIH garde ses charges négatives à sa surface et par conséquent se déplace plus rapidement (117). Le microenvironnement acide du vagin est maintenu par des bactéries productrices d'acide lactique de la flore normale telles que *Lactobacillus spp.*, mentionné précédemment, qui est localisée dans la partie inférieure du TGF (117).

2.2.2.1. Peptides antimicrobiens

Autre que l'acidité du microbiota vaginal, les peptides antimicrobiens font aussi partie des barrières chimiques que va rencontrer le VIH lors de la transmission dans le TGF (118). Les peptides antimicrobiens sont sécrétés par les neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les DC et même les cellules épithéliales. Les peptides antimicrobiens comprennent : calprotectine, cathelicidine, lysozyme, lactoferrine, SLPI (« *secretory leukoprotease inhibitor* »), alpha-defensines, beta-defensines, serpins, cystatine et Trappin-2 (« *transglutaminase substrate and wap domain containing protein* ») (119).

2.2.2.2. Chimiokines

Les chimiokines constituent une autre composante de la barrière chimique. Les chimiokines telles que *macrophage inflammatory protein-1α* (MIP-1α/CCL-3) et 1β (MIP-1β/CCL4) ont été identifiées comme étant des ligands naturels de CCR5 et en tant qu'inhibiteurs des souches

qui ont un tropisme pour le co-récepteur CCR5. Le CXCL12, un ligand naturel de CXCR4, est un inhibiteur des souches qui ont un tropisme pour le co-récepteur CXCR4. Le CCL20/MIP-3 α est efficace pour inhiber les deux souches ou les souches bi-tropiques X4 et R5 du VIH-1(120) . Le CCL20/MIP-3 α interagit directement avec le virus et non par le blocage des récepteurs. Les fonctions de ces peptides varient énormément. Par exemple, Trappin-2 est le précurseur d'Elafin qui est produit de façon constitutive par les cellules épithéliales, soit l'utérus, les trompes de Fallope, l'endo et l'ectocervix. Certaines études ont montré l'inhibition de l'attachement, de l'entrée et de la transcytose du VIH-1 par Trappin-2/Elafin dans une lignée cellulaire cancéreuse de l'endométriome humain (121). En dessous des cellules épithéliales, il y a beaucoup de cellules du système immunitaire inné, dont les macrophages, les DC, les cellules NK, les cellules de Langerhans, et les cellules T $\gamma\delta$ (119) qui sont toutes capables de former une troisième barrière que va rencontrer le VIH, la barrière cellulaire.

2.2.3. Barrière Cellulaire

Les principaux acteurs de la barrière cellulaire sont : les neutrophiles, les cellules NK, les macrophages, les DC, ainsi que toutes les autres cellules ayant des récepteurs capables de reconnaître des produits du non-soi et de déclencher une réponse contre un pathogène (122).

Suite à une infection virale, la réponse inflammatoire cause le recrutement de cellules du système immunitaire inné, dont les neutrophiles, les cellules NK, les monocytes et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules expriment plusieurs PRR qui détectent le virus et initient une réponse à l'interféron de type 1 afin de prévenir la propagation du virus.

Les neutrophiles expriment les TLR 1-9 et répondent aux pathogènes en faisant la phagocytose, en produisant des composés oxydants et en relâchant des peptides antimicrobiens tels que Trappin, les α -defensines (123, 124) – aussi connues sous le nom de HNP pour « *human neutrophil peptides* » –, des phospholipases, et des cytokines (125, 126).

Les cellules NK utérines produisent des cytokines proinflammatoires telles que le GM-CSF, l'IL-8 et l'IFN- γ , qui promeuvent la réponse inflammatoire en activant les macrophages et les cellules T cytotoxiques. De plus, les cellules NK de la muqueuse vaginale peuvent inhiber l'infection des cellules cibles par une souche du VIH à tropisme X4 via la sécrétion de CXCL12 (127). Ces cellules NK utérines expriment de hauts niveaux de CD56, mais n'expriment pas le CD16 (ou Fc γ RIII). Le CD16 est un récepteur de la région Fc de l'immunoglobuline G (IgG). Ce récepteur est nécessaire à un mécanisme qui sera expliqué plus tard, la mort par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), qui peut être effectuée par les cellules NK. Selon le phénotype des cellules NK utérines, elles possèdent un faible potentiel d'activité cytotoxique. Elles ont plutôt la capacité de sécréter une grande quantité de cytokines telles que celles déjà mentionnées ci-haut (128). Les cellules NK peuvent aussi tuer des cellules infectées par un virus en absence des anticorps, via un mécanisme indépendant d'anticorps. Ce mécanisme fait en sorte que les cellules NK expriment la molécule Fas Ligand (CD 178) à leur surface et peuvent induire la mort des cellules cibles exprimant Fas (CD95) dès qu'elles y adhèrent (129).

2.3. Immunité adaptative au VIH

En dépit des multiples barrières de protection du TGF, le VIH peut très souvent échapper aux défenses de première ligne. À ce moment, la seconde composante du système immunitaire est activée, soit l'immunité adaptative. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles qui font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (129). Elles présentent l'antigène par les molécules du CMH aux cellules T.

Suite à la présentation d'antigènes aux CPA du TGF et à la stimulation des cellules T naïves, une séquence d'événements permet une réponse à médiation cellulaire de type Th 1 et une réponse humorale de type Th 2 (106). La réponse humorale est caractérisée par la production d'anticorps qui peuvent se lier à des antigènes de multiples façons afin de les neutraliser ou de bloquer leur entrée dans une cellule. Le complexe anticorps-antigène stimule l'élimination des pathogènes via la phagocytose par les macrophages ou le complément. Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires jouent un rôle dans l'immunité humorale en conduisant à la maturation des cellules B en plasmocytes qui sécrètent des anticorps (130). L'enveloppe du VIH est le seul antigène spécifique au virus présent à la surface des particules virales. Par conséquent, l'enveloppe est très exposée aux anticorps neutralisants et non neutralisants sécrétés par les plasmocytes.

Une des différences entre les anticorps neutralisants et non neutralisants réside dans leur capacité à lier avec une grande affinité et/ou avidité l'enveloppe mature de particules virales infectieuses (131). De plus, la majorité des anticorps neutralisants neutralisent des particules virales libres en interférant avec le processus de fusion (132). Les anticorps neutralisants préviennent l'infection des cellules cibles. Quant aux anticorps non neutralisants, ils éliminent

les cellules infectées. Ils peuvent avoir un impact substantiel sur diverses infections virales en suscitant des fonctions effectrices. Ces fonctions effectrices agissent par la lyse via le système du complément, par la phagocytose de virions via la récepteur Fc et finalement par l'ADCC contre des cellules infectées (133, 134).

2.3.1. La réponse humorale au VIH à la muqueuse vaginale

La réponse humorale est le résultat de plusieurs activités qui sont coordonnées par plusieurs types de cellules. Une des molécules caractéristiques du système immunitaire adaptatif présent à la muqueuse vaginale est l'immunoglobuline (Ig) (ou l'anticorps). Il existe cinq isotypes d'Ig qui ont chacun leur activité biologique propre : les Ig G, M, A, E et D.

Dans la muqueuse génitale féminine, les IgG1 et les IgA sécrétoires (SIgA) sont les isotypes d'Ig qui dominent dans les sécrétions de cette muqueuse. Les IgG sont de deux à six fois plus nombreuses que les SIgA dans le mucus cervical et les lavages cervicovaginaux (LCV) (106). Les niveaux d'IgA correspondent à la présence de plasmocytes sécrétant des IgA dans l'endocervix. Dans l'utérus et l'endocervix, les niveaux de pIgR (« *polymeric immunoglobulin receptor* ») sont plus élevés et les cellules épithéliales responsables du transport d'IgA du tissu vers le lumen sont beaucoup plus nombreuses, et varient selon la phase du cycle menstruel (135, 136). Donc, dans le TGF supérieur, ce sont les SIgA qui dominent, mais leur abondance dépend de la phase du cycle menstruel. Les SIgA présentes dans les sécrétions des muqueuses sont différentes des IgA monomériques dans le sérum. Les IgA monomériques du sérum comprennent deux sous-classes, soit l'IgA1, qui représente 90% des IgA dans le sérum, et les IgA2 qui ne représentent que 10%. (137). Les SIgA de la muqueuse du TGF se retrouvent sous forme polymérique et contiennent une composante sécrétoire. Puisque la liaison des SIgAs

aux antigènes ne sollicite pas une réponse inflammatoire, les SIgAs sont considérées comme étant des anticorps non-inflammatoires. En inhibant l'attachement des pathogènes sur la surface des muqueuses, les SIgA sont les médiateurs primaires de l'immunité des muqueuses. Les SIgAs dimériques spécifiques au VIH du TGF bloquent la transcytose du virus à travers la barrière de cellules épithéliales (138). Les SIgAs dimériques spécifiques peuvent neutraliser et bloquer la transcytose du virus sans solliciter de réponse inflammatoire (138, 139). Bien que la sécrétion d'IgA soit contrôlée par le système hormonal au cours du cycle menstruel, les variations de la production locale sont induites plus tard par la stimulation antigénique. Quant aux IgGs de la muqueuse vaginale, les travaux de recherches de l'équipe dirigés par Dr. Xiaoping Zhu ont démontré que ces IgGs voyagent par l'intermédiaire du récepteur Fc néonatal (FcRn) exprimé sur les cellules épithéliales du TGF (140). Le FcRn aide la transcytose des IgG à travers les cellules. L'interaction entre la portion Fc de l'IgG au FcRn est dépendante du pH : la liaison de l'IgG au FcRn se fait dans un milieu acide (soit un pH $\leq 6,5$) et la relâche de l'IgG se fait dans un milieu neutre (pH 7,0-7,5) (141). Bref, l'immunité humorale, sous forme d'anticorps à la surface des muqueuses, ainsi que dans le sang a le potentiel de constituer un élément clé pour empêcher le VIH de s'emparer complètement du système immunitaire.

2.3.2. La réponse humorale au VIH dans le compartiment systémique

Quant aux IgAs dans le sérum, elles stimulent une panoplie de fonctions effectrices. Ces IgA1 monomériques du sérum sollicitent des activités proinflammatoires lorsqu'elles se lient au récepteur d'IgA myéloïde, CD89 (Fc α RI) (139).

Lors de la phase aïgue d'une infection par le VIH, la réponse initiale des anticorps, dirigée contre l'enveloppe, provient d'anticorps non-neutralisants. Certains spéculent que la présence de virions ayant des enveloppes sous une forme dénaturée ou non-fonctionnelle pourrait être responsable de ces anticorps non-neutralisants (142). La détection d'IgG spécifique à la gp41 a lieu 13 jours après l'infection. Ceux contre la gp120 de l'enveloppe apparaissent 14 jours post-infection. Or, tous ces anticorps sont non-neutralisants (voir figure 6 A) (143).

Quant aux anticorps neutralisants, ils sont rarement générés durant une infection par le VIH. Par contre, lorsqu'ils sont générés, ils apparaissent deux à trois ans post-infection, et uniquement chez 20% des individus infectés (143, 144). Malgré leur rareté, ces anticorps à large spectre, qui sont spécifiques aux épitopes conservés de l'enveloppe, nous ont permis d'identifier des sites de vulnérabilité sur l'enveloppe du VIH-1 (Figure 5) tels que le site de liaison du CD4 à la gp120 (« *CD4 binding site* » ou CD4bs) (145), les régions variables V1V2 de la gp120 (146), les glycanes sur la V3 de la gp120 (147), la région membranaire externe proximale (MPER) de la gp41 (148, 149) et finalement, l'épitope quaternaire qui comprend la gp120 et la gp41 (150, 151).

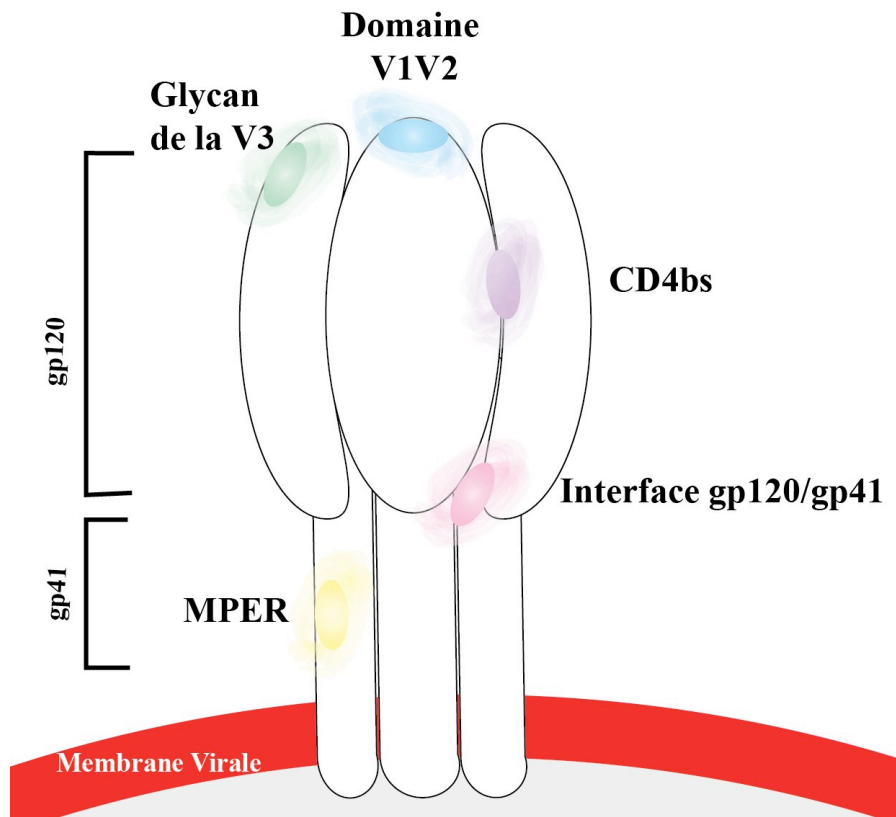


Figure 5 Les sites de vulnérabilité sur l'enveloppe du VIH-1 reconnus par les anticorps neutralisants à large spectre

Ce sont des processus d'hypermutation somatique qui sont responsables de la maturation de l'affinité de ces anticorps (152). Plusieurs stratégies thérapeutiques dépendent de la génération de ce type d'anticorps (réponse neutralisante et protectrice) (153).

Ceci dit, les anticorps neutralisants à large spectre mentionnés plus haut sont très difficiles à générer chez l'hôte sain (154). L'un des obstacles majeurs est le manque d'immunogènes pour générer ces anticorps neutralisants. Une solution à ce problème consiste à développer des trimères solubles des protéines de l'enveloppe du VIH-1 qui imitent adéquatement la structure native de celle-ci tout en exposant des sites de vulnérabilité de l'enveloppe reconnus par des

anticorps. Le développement de ce trimère soluble de l'enveloppe demeure pour le moment un travail inachevé.

Pour ce qui est des anticorps neutralisants et non neutralisants spécifiques envers le VIH, leurs activités ne sont pas toujours exclusives, ces deux activités (neutralisantes et non neutralisantes) peuvent contribuer à prévenir l'infection de façon complémentaire (155).

La figure 6 B illustre l'interaction entre l'enveloppe du VIH et le CD4 au sein d'une même cellule. En outre, certaines études ont observé l'interaction Env-CD4 au sein d'une même cellule par des expériences de transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET) (93). Les sites de vulnérabilité exposés lors de l'interaction Env-CD4 de certains anticorps non neutralisants peuvent se diviser en trois groupes selon la région de l'enveloppe qu'ils reconnaissent. Le groupe A reconnaît les résidus N-et C-terminaux sur la gp120 qui cache la gp41 (156). L'anticorps monoclonal A32 et CH54 sont des exemples d'anticorps du groupe A (155) (Figure 6 B). Ensuite, les anticorps tels que N12-il5, faisant partie du groupe B, reconnaissent la région proximale du site de liaison au corécepteur et implique les domaines V1V2 (Figure 6 B). Finalement, les anticorps du groupe C ciblent le site de liaison du corécepteur, comme l'anticorps monoclonal 17b (156).

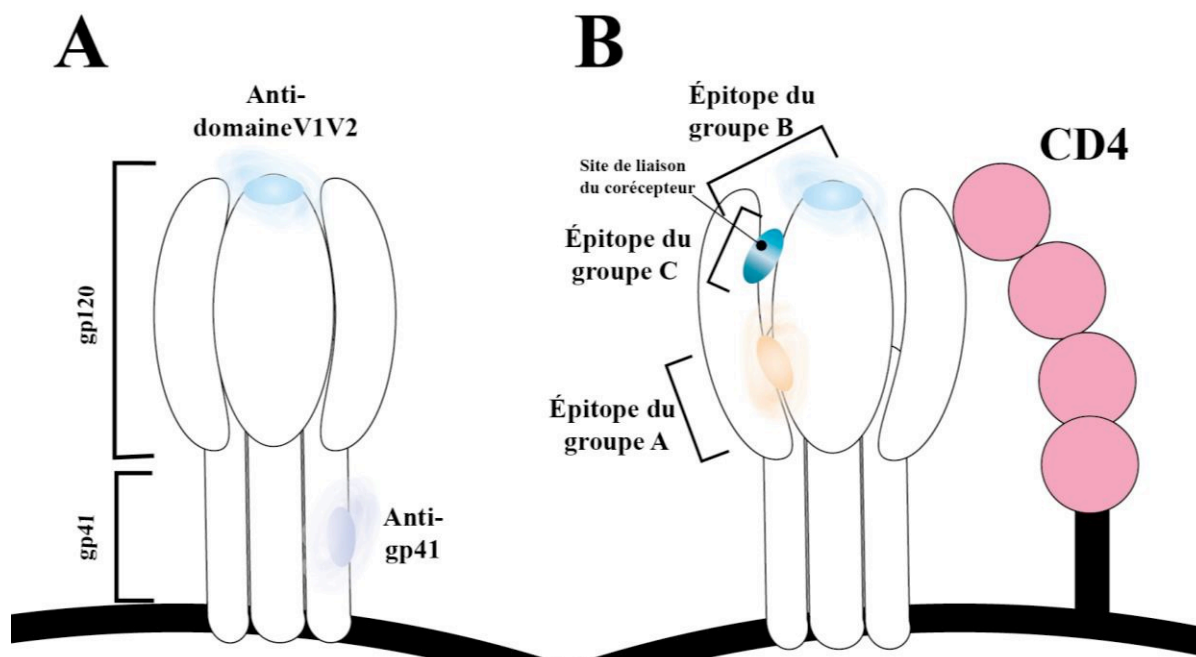


Figure 6 Les sites de vulnérabilité sur l'enveloppe du VIH-1 ciblés par les anticorps non-neutralisants en l'absence (A) ou en présence (B) de CD4

2.3.3. Le pont entre la réponse innée et adaptative : la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

Autres que la reconnaissance des sites de vulnérabilité de l'enveloppe du VIH, l'un des moyens par lequel l'immunité humorale sous forme d'anticorps puisse constituer un élément important dans la lutte contre le VIH est l'activité que peut stimuler ces anticorps. Cette activité est parfois stimulée par l'entremise d'acteurs de l'immunité innée.

Les acteurs de l'immunité innée mentionnés plus haut (macrophages, monocytes, neutrophiles, cellules NK) sont parfois doués d'un potentiel cytotoxique lorsqu'ils expriment des récepteurs de la région Fc. Malgré que ces cellules cytotoxiques ne soient pas spécifiques à un antigène, c'est la spécificité de l'anticorps qui fait le pont entre la réponse innée et adaptative

et qui dirige les cellules cytotoxiques vers les cellules cibles à éliminer. Ce mécanisme est appelé ADCC (129).

L'ADCC était l'une des premières fonctions d'anticorps observées chez les individus séropositifs (157). La glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1 est le principal antigène à la surface de cellules infectées pour les anticorps qui induisent ce type d'activité (157, 158). Quelques-uns des premiers anticorps produits lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH sont connus pour leur capacité à stimuler une réponse ADCC (159, 160).

De plus, l'importance de ce mécanisme de protection contre le VIH-1 refait surface, car il a récemment été suggéré que l'ADCC applique une assez forte pression immune sur le VIH, qui force des mutations virales qui ont pour but d'évader à la reconnaissance par le système immunitaire. Ceci met en évidence l'impact potentiel que peut avoir ce mécanisme sur la progression de la maladie causée par le VIH (161).

L'importance de ce mécanisme immunitaire dans la lutte contre le VIH a également été soulevée lors de l'essai clinique d'un vaccin contre le VIH-1 en Thaïlande, le RV144, où la réponse protectrice (efficacité vaccinale) était de 31.2 % (162). Cet essai vaccinal a montré que la production d'IgG qui se lie à la surface de cellules infectées et induit une réponse ADCC (163-165) corrèle avec une protection contre l'acquisition d'une infection par le VIH-1 (162). Les IgG qui ciblaient des épitopes dans la région constante 1 (conformation C1) de la gp120 étaient associées à une protection. Quant aux IgA spécifiques au VIH dans le sérum, elles étaient associées à une augmentation du risque d'infection parce qu'elles atténuent l'activité protectrice des IgG (162, 166). Ces IgA1 reconnaissent mieux la conformation C1 de

l'enveloppe que les IgG. Or, ces IgA ne stimulaient pas d'activité ADCC via les cellules NK, mais elles bloquaient plutôt les fonctions effectrices des IgG qui reconnaissent la même conformation de l'enveloppe virale. Les IgA1 fixaient les épitopes de la conformation C1 de l'enveloppe 2.9 fois plus que les IgG. Malgré la compétition des IgG/IgA pour la conformation C1 de l'enveloppe (166), cet essai clinique a soulevé l'espoir sur ce mécanisme de protection contre le VIH-1 et a attiré l'attention sur la réponse humorale sous forme d'anticorps. Les anticorps isolés de l'essai clinique RV144 qui avaient la capacité de stimuler une réponse ADCC isolée étaient de nature non neutralisante. Des études sur ces anticorps ont montré que l'interaction de l'enveloppe du VIH-1 avec le CD4 coexprimé induit des changements conformationnels au niveau de l'enveloppe virale qui résulte dans l'exposition des épitopes induits par CD4 (CD4i) (93).

Comme il a déjà été indiqué, les changements conformationnels de l'enveloppe virale qui se font suite à la fixation de CD4 exposent des épitopes reconnus par les anticorps qui stimulent l'ADCC. Cependant, les deux protéines virales accessoires, soit Nef et Vpu, sont impliquées dans la dégradation de la molécule de CD4 dans les cellules infectées. De récentes études décrivent un mécanisme hautement conservé nécessaire pour exposer des épitopes ayant la capacité de stimuler l'ADCC, ce qui pourrait aider à expliquer l'avantage évolutif de la régulation négative de CD4 à la surface des cellules par les protéines accessoires Nef et Vpu (93). La régulation négative de CD4 par Nef et Vpu peut aider à prévenir la mort des cellules infectées par le mécanisme d'ADCC. Les virus dépourvus de la capacité de réguler négativement CD4, ou qui avaient des niveaux élevés de protéines d'enveloppe à la surface des cellules infectées dû à la délétion de Nef et Vpu ont présenté une augmentation

significative de l'élimination des cellules par l'ADCC. En somme, ceci suggère que l'une des conséquences de l'activité de Nef et de Vpu peut être le masquage des épitopes potentiels capables de stimuler de l'ADCC (93).

D'une part, il a été démontré que l'ADCC corrèle avec une protection contre l'acquisition du VIH-1. D'autre part, des chercheurs ont démontré l'importance des changements de conformation de l'enveloppe dans l'exposition des épitopes qui peuvent être reconnus par des anticorps qui peuvent stimuler une réponse ADCC (93). Bref, l'étude des changements de conformation de l'enveloppe s'avère cruciale pour comprendre et identifier les épitopes qui sont reconnus par des anticorps qui peuvent induire une réponse protectrice contre le VIH.

2.4. L'enveloppe du VIH et ses changements de conformation

Les étapes d'entrée par fusion du virion libre dans une cellule cible qui sont décrites à la section 1.5 et illustrées à la Figure 3 comportent beaucoup de changements de conformation au sein des protéines de l'enveloppe du VIH. La gp120 est responsable de l'interaction avec CD4 (167, 168). De plus, la liaison de CD4 induit des changements dans la gp120 qui favorisent l'interaction avec l'un des corécepteurs du VIH (169-171). Comme ces étapes sont clés dans l'entrée du virion dans une cellule, il est essentiel, pour bloquer cette entrée, de comprendre la structure de la gp120 et ses différentes conformations. Enfin, la compréhension de l'importance de ces changements de conformation lors de l'entrée du virus est aussi pertinente pour la conception d'un immunogène qui pourrait favoriser la reconnaissance du VIH par les anticorps qui peuvent induire une réponse protectrice.

D'abord, pour bien comprendre les changements au sein de la gp120, il faut en connaître la composition. La gp120 est composée de deux domaines. Premièrement, un domaine interne constitué de trois couches qui sont identifiées en tant que couches 1, 2 et 3 (172). Et deuxièmement, un domaine externe hautement glycosylé (173). La liaison de la gp120 au CD4 est modulée par des mouvements dans ces trois couches du domaine interne de la gp120 (174, 175). Quant au domaine externe, il demeure intact, c'est-à-dire qu'il ne change pas de conformation. Lors de la liaison au CD4, dans le domaine interne de la gp120, la couche 1 interagit avec la couche 2 (174). Puis, la couche 3 interagit aussi avec la couche 2 (175). Ces interactions contribuent au réarrangement du domaine interne de la gp120, ce qui contribue à l'ouverture de l'apex de l'enveloppe du VIH (Figure 6B) (175). En somme, les changements de conformation des couches 1, 2 et 3 du domaine interne de la gp120 sont importantes, car elles peuvent servir de cible pour les anticorps qui stimulent une activité ADCC (93, 156, 176, 177). Rappelons-nous, la conformation de la gp120, lorsqu'elle est liée au CD4, est celle qui expose des épitopes de l'enveloppe qui sont reconnus par des anticorps qui peuvent provoquer une réponse protectrice contre le VIH, comme l'ADCC.

3. Immunité naturelle à l'infection par le VIH-1

En dépit des nombreuses réponses immunes innées et adaptatives, sans traitement ARV, dans la majorité des cas, l'infection par le VIH va mener à la progression de la maladie qui se termine par une immunodéficience. Toutefois, l'exposition répétée au VIH ne mène pas toujours à une infection. En outre, certaines personnes présentent une immunité naturelle au VIH. L'immunité naturelle se définit par un phénotype où certains individus sont exposés à un risque très élevé d'infection mais demeurent sans aucun signe apparent d'infection au VIH-1.

C'est une définition épidémiologique et non biologique reliée à des facteurs environnementaux et comportementaux soutenue par des facteurs immunologiques mesurés (178-180). Comprendre les mécanismes qui protègent ces individus contre l'infection peut s'avérer important pour le développement de stratégies thérapeutiques et préventives contre le VIH-1.

3.1. Un modèle de protection contre l'acquisition de l'infection

Les individus qui ne font pas séroconversion suite à plusieurs expositions au virus peuvent être des individus qui ont plusieurs relations sexuelles non protégées avec des partenaires concomitants séropositifs, et qui demeurent séronégatives, comme des travailleuses du sexe séronégatives.

L'hypothèse principale sur laquelle repose l'explication de cette immunité naturelle au VIH-1 est liée à la capacité que semble avoir l'hôte à préserver l'intégrité systémique du système immunitaire tout en contrôlant la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire, et en ayant moins de cellules cibles à la voie d'entrée principale du VIH-1, soit la muqueuse (181).

3.1.1. Facteurs associés à l'immunité naturelle

Les facteurs environnementaux et comportementaux qui sont soutenus par des preuves immunologiques associées à l'immunité naturelle sont nombreux. Cette section présente quelques facteurs immunologiques qui sont associés à l'immunité naturelle.

Des études antérieures de notre équipe ont démontré qu'au sein d'une cohorte de travailleuses du sexe béninoises (TSB), les travailleuses du sexe séronégatives (TS-) avaient démontré une expression plus faible de cytokines proinflammatoires telles que TNF- α (« *tumor necrosis*

factor-alpha ») et IFN- γ dans le LCV, comparé aux travailleuses du sexe séropositives (TS +) (182), ce qui pourrait favoriser l'infection des cellules cibles à la muqueuse vaginale et ce qui contribuerait à l'inflammation locale chez ces femmes infectées. Des résultats similaires ont également été observés dans d'autres cohortes de TS-, telles que celles au Kenya (183). Des recherches antérieures de notre équipe ont également démontré qu'un niveau plus élevé de beta-chimiokines (β -chimiokines) telles que MIP-1 α ou CCL-3 et MIP-1 β ou CCL-4, au niveau systémique comparé à la muqueuse génitale serait associé à une protection contre l'infection au VIH-1(184). MIP-1 α et MIP-1 β ont été identifiés comme étant des ligands naturels de CCR5 (185, 186) et des inhibiteurs des souches virales qui ont un tropisme R5 (170). Des niveaux d'expression plus élevés des gènes codant pour CCL3 et CCL4 ont aussi été associés à un risque plus faible d'infection au VIH (187, 188). Cependant, lorsque ces β -chimiokines se lient à CCR5, cela entraîne l'internalisation du récepteur et élimine ainsi la capacité des souches R5 à infecter les cellules (189).

Il y a d'autres facteurs qui sont associés à l'immunité naturelle, tels que les β -chimiokines qui ont été retrouvées à un taux plus élevé dans la muqueuse vaginale de travailleuses du sexe HESN du Kenya. Dans cette cohorte, ces HESN avaient des niveaux plus élevés de cellules T CD4+ et T CD8+ dans la muqueuse vaginale comparé au groupe contrôle. Une réponse CTL spécifique au VIH a aussi été observée chez les HESN (190) et a été associée à une immunité naturelle. L'activité lytique des cellules NK utérines chez des injecteurs de drogues intraveineuses HESN au Vietnam était plus élevée que celle observée chez le groupe contrôle. Aussi, le pourcentage de cellules NK qui produisent de l'IFN- γ , du TNF- α et des β -chemokines (CCL3, CCL4, CCL5) est plus élevé chez ces personnes (191). La présence d'IgA

sécrétoire dans le LCV de HESN ayant la capacité de neutraliser le virus et de bloquer sa transcytose à travers la barrière épithéliale de la muqueuse vaginale est très controversée, mais plusieurs groupes associent les IgA sécrétoires de la muqueuse vaginale à l'immunité naturelle au virus (192-194).

Il y a également des facteurs génétiques qui sont associés à l'immunité naturelle. La délétion de trente-deux paires de bases dans le gène de récepteur de chimiokine CCR5 (CCR5 Δ 32) mène à l'expression d'un récepteur tronqué qui n'est pas transporté à la surface cellulaire. La présence de cet allèle sous sa forme homozygote est un facteur génique qui a été associé à la protection contre l'infection par le VIH, parce que le co-récepteur principal du virus est absent (195, 196). Cet allèle surreprésenté dans les cohortes d'individus caucasiens exposés mais non infectés est absent chez les individus exposés mais non infectés africains (197). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que cette mutation aurait surgi suite à la pandémie de peste noire qui a touché la population européenne entre 1347 et 1352 (198).

HYPOTHÈSES

On présume que l'immunité naturelle des travailleuses du sexe béninoises séronégatives pourrait être associée à la capacité de l'hôte à produire des facteurs solubles dans leur sang et leur LCV qui confère une protection contre l'infection par le VIH-1.

OBJECTIFS

L'objectif est de cribler dans un système *in vitro* le sérum et les LCV pour évaluer leur potentiel de neutralisation envers le VIH-1 et leur potentiel d'élimination des cellules cibles recouvertes de gp120 par l'ADCC.

DESCRIPTION DE LA POPULATION BÉNINOISE À L'ÉTUDE

Nous avons mené une étude au sein d'une cohorte de travailleuses du sexe (TS) hautement exposées au VIH-1 provenant de la ville de Cotonou au Bénin, dont certains individus ont été identifiés comme étant des personnes qui demeurent non infectées au virus après plus de sept ans de prostitution. Cette absence d'infection, malgré la forte exposition, peut être qualifiée comme un exemple d'immunité naturelle au VIH. En effet, tel que mentionné plus haut, les recherches de notre équipe ont démontré que le profil d'expression des cytokines diffère dans le sang et dans les voies génitales chez les TS+ et TS- (184), ce qui pourrait avoir une influence sur l'immunité naturelle au VIH. L'expression de cytokines peut réguler des fonctions immunes du tractus génital féminin, ce qui joue aussi un rôle (106).

Notre étude porte sur deux groupes de femmes : des TS+ non traitées avec des antirétroviraux avec moins de trois ans de prostitution et des TS- de façon persistante avec sept ans ou plus de prostitution active. Les femmes exclues avaient moins de dix-huit ans. Elles étaient menstruées lors de la visite. Elles étaient enceintes. Elles avaient d'autres infections transmises sexuellement (ITS) telles que la gonorrhée, le chlamydia, la syphilis, la trichomonas, une candidose ou une vaginose bactérienne.

Les femmes recrutées dans notre étude ont d'abord fourni un consentement éclairé. Par la suite, elles ont répondu à un questionnaire portant sur leurs habitudes et leurs comportements sexuels ainsi que leur historique sociodémographique (Table 1 de l'article). Un examen

gynécologique a été réalisé pour le dépistage des ITS et pour procéder au prélèvement du LCV. Un prélèvement sanguin a aussi été effectué. Dans notre étude, les TS recrutées étaient toutes d'origine africaine et n'avaient pas la délétion de trente-deux paires de bases dans le gène codant pour le récepteur de chimiokine CCR5.

ARTICLE :

Anti-HIV-1 envelope IgGs in blood and cervicovaginal samples of Beninese commercial sex workers

Laurie-Anne BATRAVILLE^{1,2}, Jonathan RICHARD^{1,2}, Maxime VEILLETTE^{1,2}, Annie-Claude LABBÉ², Michel ALARY^{3,4}, Fernand GUÉDOU⁵, Daniel E KAUFMANN^{1,6}, Johanne POUDRIER^{1,2}, Andrés FINZI^{1,2,7*}, Michel ROGER^{1,2*}

Publié dans le journal: AIDS Research and Human retroviruses

Contribution des co-auteurs :

Annie-Claude Labbé, Fernand Guédou et Michel Alary sont responsable du recrutement des participantes et ont fourni des données de laboratoire et des données cliniques. Johanne Pourdrier, Andrés Finzi et Michel Roger ont contribué à l'élaboration des plans de l'étude. Jonathan Richard et Maxime Veillette ont contribué à la réalisation des expériences qui portent sur l'élimination des cellules cibles revêtues de gp120 par ADCC. Daniel E Kaufmann a fourni les échantillons de PBMC de donneurs sains pour l'essai d'élimination des cellules cibles revêtues de gp120 par ADCC. Laurie-Anne Batrville a réalisé les expériences d'ELISA sur base cellulaire, de neutralisation et d'élimination des cellules cibles revêtues de gp120 par ADCC. Michel Roger et Andrés Finzi sont les chercheurs principaux du projet. L'article a été rédigé par Laurie-Anne Batrville, Andrés Finzi et Michel Roger.

SHORT COMMUNICATION

Anti-HIV-1 envelope IgGs in blood and cervicovaginal samples of Beninese commercial sex workers

Laurie-Anne BATRAVILLE^{1,2}, Jonathan RICHARD^{1,2}, Maxime VEILLETTE^{1,2}, Annie-Claude LABBÉ², Michel ALARY^{3,4}, Fernand GUÉDOU⁵, Daniel E KAUFMANN^{1,6}, Johanne POUDRIER^{1,2}, Andrés FINZI^{1,2,7*}, Michel ROGER^{1,2*}

¹Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ²Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, ³Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, Canada, ⁴Département de médecine sociale et préventive, Université Laval, Québec, ⁵Dispensaire des IST, Cotonou, Benin, ⁶Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA, ⁷Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

*Corresponding authors: Michel Roger and Andrés Finzi, Centre de recherche du CHUM (CRCHUM)

Running title: HIV-1 ADCC and Neutralizing Activities in CSWs

Word count: Abstract: 165, Text (excluding abstract): 1511

Funding: This work was supported by grant # HOP-79213 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to MR and by CIHR catalyst #126630, CRCHUM continuum, and the Réseau SIDA from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) grants to MR and AF. AF is a recipient of a Canada Research Chair on Retroviral Entry.

Abstract

Background

Characterization of the immune correlates of protection against HIV infection is crucial for the development of preventive strategies. This study examined HIV-1-envelope glycoproteins (Env) specific IgG in systemic and mucosal compartments of female Beninese sex workers (CSWs).

Findings

Samples of 23 HIV-1-positive and 20 highly-exposed HIV-1-seronegative (HESN) CSWs were studied. HIV-1-Env specific IgG detection in sera and cervico-vaginal lavages (CVLs) from the study population was done by cell-based ELISA. The HIV neutralizing activity was evaluated with a neutralization assay. HIV-1 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) response of the cohort was measured with a FACS-based assay evaluating the ADCC-mediated elimination of gp120-coated target cells. No anti-HIV-1-Env-specific IgG, neutralizing or ADCC activities were detected in samples from HESN CSWs. Samples from HIV-1-infected CSWs presented ADCC activity in both sera and CVLs. Anti-Env IgG from sera and CVLs from HIV-1-infected CSWs preferentially recognized the Env in its CD4-bound conformation.

Conclusion

HIV-1-infected CSWs have ADCC-mediating IgG that preferentially recognize Env in its CD4-bound conformation at the mucosal site.

Key Words: HIV-1, antibodies, neutralization, ADCC, blood, genital mucosa, sex workers.

Findings

Globally, more than 90% of HIV-1 transmission occurs across the mucosal surfaces *via* hetero-or homosexual contacts ^{1, 2}. A better understanding of the mechanisms of transmission and HIV-specific immune responses at the initial site of infection is therefore pivotal to the design of preventive strategies. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) response is an antibody-driven immune mechanism that recruits effector cells and activates them against infected cells expressing surface antigens, resulting in their elimination, and may play a protective role at mucosal surfaces. Analysis of correlates of protection from the RV144 vaccine trial suggested that increased ADCC activity was linked with decreased HIV-1 acquisition ^{3, 4}. Unfortunately, mucosal samples were not collected during the RV144 trial to assess mucosal Envelope (Env)-specific Ig levels and antibody functions. In other studies, ADCC-mediating antibodies were observed in cervicovaginal lavages (CVLs) of HIV-infected women ⁵ and ADCC activity was negatively correlated with genital viral loads ⁶. The study of highly-exposed HIV-seronegative (HESN) individuals, such as HIV-1-uninfected commercial sex workers (CSWs), who may represent a model of natural immunity to HIV-1, may yield important clues to the development of preventive approaches. High levels of anti-inflammatory and neutralizing proteins were found in the genital mucosa of HESN CSWs ⁷. To date, a number of reports in the literature ^{8, 10, 13, 14} have failed to detect anti-HIV-1 envelope specific IgG in HESN. However, in these studies the detection of anti-HIV-1 Env specific IgG was performed by looking at gp120 Env in its monomeric context ^{10, 13, 15} and/or looked at the two Env subunits gp120 and gp41 separately ¹⁰. To our knowledge, none looked at Env trimer in its wholesome. The importance of trimeric Env is pivotal because it is the only virus-specific antigen present at the surface of viral particles and as such, is highly

exposed and thus elicits neutralizing and non-neutralizing antibodies. Env assembles into spike-like projections consisting of three gp120-gp41 heterodimers that form the Env trimer, upon which the virus depends for attachment and fusion with target cells ¹⁶. In this paper, we screened sera and CVLs from HIV-1-infected and -uninfected CSWs for the presence of anti-Env IgG as well as for their potential to neutralize HIV-1 viral particles and/or mediate ADCC.

This study was approved by the Ministère de la Santé du Bénin and by the CHUM human research ethics boards. Written consent was obtained from every participant.

The study population consists of untreated HIV-1 positive female CSWs with less than 3 years of prostitution (n=23) and HIV-1 negative female CSWs with more than 7 years of prostitution (n=20) enrolled through a sex worker clinic in Cotonou, Benin. Women who were less than 18 years of age, pregnant, menstruating during the visit, or taking oral contraceptives were excluded from the study. Demographic and sexual behavioral information are shown in Table 1. Participants also underwent a genital examination by a physician. None of these women had vaginosis, candidiasis, or other sexually transmitted infections at the time of the visit. The specimen collection and processing was performed using methods described previously ¹⁷.

In order to assess whether protection from HIV-1 in the HESN CSWs is associated with HIV-1-Env-specific IgGs, we first screened sera and CVLs of the study participants through a cell-based ELISA assay that express fully cleaved mature HIV-1 Env glycoprotein trimers at the surface of cells ^{18, 20}. The detection of trimeric HIV-1 Env at the surface of Hos cells was

performed by cell-based ELISA as previously described^{18, 19}. Briefly, 2×10^4 Hos cells were plated in 96 wells plates and transfected the next day using a standard polyethylenimine (PEI) transfection technique with 0.15 μg of the pSVIII plasmid expressing a cytoplasmic tail-deleted HIV-1_{YU2} envelope glycoprotein and 0.01 μg of a Tat-expressing plasmid per well, as reported¹⁸. For co-expression of CD4, 0.007 μg of pCDNA3.1 CD4 expressing plasmid^{18, 20} was added to the transfection mix. After 48 hrs, the detection of trimeric HIV-1 Env was performed in triplicate for each sample. The murine leukemia virus (MLV) envelope was used as a negative control. No anti-HIV-1-Env specific IgGs were detected in sera and CVLs from HIV-1-negative CSWs (Figure 1 A-B). However, all HIV-1-positive CSWs had IgGs that were able to recognize the trimeric Env in their sera and CVLs. Importantly, anti-HIV-1-Env specific IgGs found in HIV-1-positive CSWs better recognized Env when it was co-expressed with CD4 (Figure 1 A-B) and thus sampled the CD4-bound conformation^{18, 20}. We then performed an HIV-1 specific neutralization screening assay with clade B envelope-pseudotyped viral particles in order to determine if protection might be associated with the production of highly potent neutralizing factors, other than IgGs, in both sera and CVLs. (Figure 1 C-F). The neutralization assay was performed as previously reported²¹. Briefly, HIV-1 viral particles were produced by calcium phosphate transfection into 293T human embryonic cells lines with an env-deleted pNL4-3 molecular clone expressing the luciferase reporter gene (pNL4-3-Luc Δ Env) and pseudotyped by co-transfecting HIV-1 Env expressors from clades A and B. Cf2Th-CD4/CCR5 cells were placed in 96 well plates (2×10^4 cells per well) and infected the next day. Previous to infection, infectious viral particles were pre-incubated with serial dilutions of patient's serum or CVLs before infecting cells^{21, 22}. Luciferase activity was measured 48h later with a luminometer. Comparing the luciferase

activity across the samples serial dilutions assessed the neutralizing activity of each sample. Neutralizing assays were done in quadruplicate for each sample. The MLV envelope was used as a negative control. Our assay failed to detect neutralizing factors in sera or CVLs from HIV-1-negative CSWs. However, sera of HIV-1-positive CSWs were able to specifically reduce the infectivity of HIV-1 viral particles (Figure 1C). Because it has been reported that neutralizing antibodies are generally strain specific, being only able to neutralize the patient's own (autologous) virus ²⁴, we repeated these neutralization assays with viral particles bearing a clade A Env (predominant subtype in Benin) ²⁵ and again we did not detect any significant neutralization in the samples of HIV-1-uninfected CSWs (not shown).

We then investigated whether CSWs presented antibodies in the systemic and mucosal compartments could eliminate gp120-coated target cells through ADCC. Recombinant HIV-1_{YU2} gp120 proteins were produced and purified as previously described ^{19, 21}. CEM.NK_r target cells were coated with 50 ng of recombinant HIV-1 gp120 (per 7.5×10^5 cells) for 30 min at 37°C before being stained for 20 min with a viability marker (AquaVivid, Invitrogen) and a cellular marker (eFluor 670, eBiosciences). Cryo-preserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were labeled with a cellular marker (eFluor450, eBiosciences) and used as effector cells in this assay. Cell labeling was performed according to manufacturer's directions. Target and effector cells were placed together and incubated together for 4-6h with serum diluted 1:1000 or CVL 1:100, cells were fixed with 2% PBS-formaldehyde solution containing a constant amount of flow cytometry particles (5×10^4 /ml) (AccuCount Blank Particles, 5.3 μ m; Spherotech). A constant number of particles (1×10^3) were counted during cytometry acquisition in order to normalize the number of viable

targets cells that survived and to calculate the percentage of ADCC-mediated killing. Each sample was acquired with a LSRII, and data analysis was performed using FlowJoVX.0.6²³.

Interestingly, ADCC activity was found in both sera and CVLs of HIV-1-positive CSWs and levels were significantly higher than those observed in samples from HIV-1-negative women where no specific anti-Env were detected (Figure 1 G-H). Finally, we observed no correlation in the ability of sera from HIV-1-positive CSWs to neutralize the virus and to mediate an effective gp120-coated ADCC response (data not shown).

In the present study, we used highly-sensitive and HIV-1 specific assays and found that protection from HIV-1 in HESN CSWs from Benin was not associated with HIV-1 specific neutralizing factors or the ability of the host to produce ADCC-mediated Abs against gp120 epitopes in both the systemic and genital mucosal compartments. In addition, there were no anti-HIV-1 Env specific IgGs in either the serum or CVLs from HESN CSWs, as detected by our cell-based ELISA assay using trimeric Env. Therefore, we found no evidence that HIV-1 resistance in the HESN CSWs from Benin was associated with HIV-1-specific neutralizing and ADCC functions. This protection may be rather linked with the host's capacity to preserve systemic integrity by constraining immune activity and controlling inflammatory conditions at the mucosal point of entry, as recently suggested⁷. HIV-1-positive CSWs have the ability to develop anti-HIV-1-Env specific IgGs that detects trimeric Env in both blood and mucosal fluids. Moreover, these HIV-1-Env specific IgGs might be responsible for both the HIV-1 specific neutralizing and ADCC activities observed in the sera and CVLs of some of these women. More importantly, our results show for the first time that HIV-1-Env specific IgG in genital mucosal compartments preferentially target Env in its CD4 bound conformation and that these IgGs might be involved in ADCC responses at the mucosal site. Altogether, these

findings suggest that future mucosal vaccines should aim to induce the production of CD4 induced anti-Env antibodies in the genital mucosa to mediate a more effective ADCC response to eliminate HIV-infected cells at the portal site of entry.

Competing interest: The authors declare no financial conflict of interest.

Authors' contributions: M.R. and A.F. are the lead investigators of this study and with LA.B., DE.K. and J.P. designed the experiments, LA.B., M.V., and J.R. performed the experiments. M.R., A.F. and LA.B wrote the manuscript. AC.L., F.G., and M.A. were responsible for the participants' recruitment and provided clinical and laboratory data. All authors edited and approved the final version of the manuscript.

Reference

1. Kresina TF, Mathieson B. Human immunodeficiency virus type 1 infection, mucosal immunity, and pathogenesis and extramural research programs at the National Institutes of Health. *J Infect Dis.* May 1999;179 Suppl 3:S392-396.
2. Overbaugh J, Kreiss J, Poss M, et al. Studies of human immunodeficiency virus type 1 mucosal viral shedding and transmission in Kenya. *J Infect Dis.* May 1999;179 Suppl 3:S401-404.
3. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med.* Apr 5 2012;366(14):1275-1286.
4. Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J Virol.* Nov 2012;86(21):11521-11532.
5. Battle-Miller K, Eby CA, Landay AL, Cohen MH, Sha BE, Baum LL. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in cervical lavage fluids of human immunodeficiency virus type 1--infected women. *J Infect Dis.* Feb 15 2002;185(4):439-447.
6. Nag P, Kim J, Sapiega V, et al. Women with cervicovaginal antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity have lower genital HIV-1 RNA loads. *J Infect Dis.* Dec 1 2004;190(11):1970-1978.
7. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:875821.
8. Dorrell L, Hessel AJ, Wang M, et al. Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia. *AIDS.* Jun 16 2000;14(9):1117-1122.
9. Alexander R, Mestecky J. Neutralizing antibodies in mucosal secretions: IgG or IgA? *Curr HIV Res.* Nov 2007;5(6):588-593.
10. Mestecky J, Wright PF, Lopalco L, 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.* May 2011;27(5):469-486.
11. Devito C, Broliden K, Kaul R, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol.* Nov 1 2000;165(9):5170-5176.
12. Yu X, Duval M, Lewis C, et al. Impact of IgA constant domain on HIV-1 neutralizing function of monoclonal antibody F425A1g8. *J Immunol.* Jan 1 2013;190(1):205-210.
13. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS.* Jan 14 1999;13(1):23-29.
14. Buchacz K, Parekh BS, Padian NS, et al. HIV-specific IgG in cervicovaginal secretions of exposed HIV-uninfected female sexual partners of HIV-infected men. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Dec 10 2001;17(18):1689-1693.
15. Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, et al. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med.* Nov 1997;3(11):1250-1257.
16. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* Jun 19 1998;280(5371):1884-1888.

17. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol.* Jul 2008;1(4):309-316.
18. Veillette M, Coutu M, Richard J, et al. Conformational Evaluation of HIV-1 Trimeric Envelope Glycoproteins Using a Cell-Based ELISA Assay. *Journal of Visualized Experiments.* 2014(e51995).
19. Desormeaux A, Coutu M, Medjahed H, et al. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *J Virol.* Mar 2013;87(5):2549-2562.
20. Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol.* Mar 2014;88(5):2633-2644.
21. Finzi A, Xiang SH, Pacheco B, et al. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol Cell.* Mar 12 2010;37(5):656-667.
22. LaBonte JA, Patel T, Hofmann W, Sodroski J. Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J Virol.* Nov 2000;74(22):10690-10698.
23. Richard J, Veillette M, Batrville L-A, et al. Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. *Submitted.* 2014.
24. Wei X, Decker JM, Wang S, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* Mar 20 2003;422(6929):307-312.
25. Chamberland A, Diabate S, Sylla M, et al. Transmission of HIV-1 drug resistance in Benin could jeopardise future treatment options. *Sex Transm Infect.* Apr 2012;88(3):179-183.

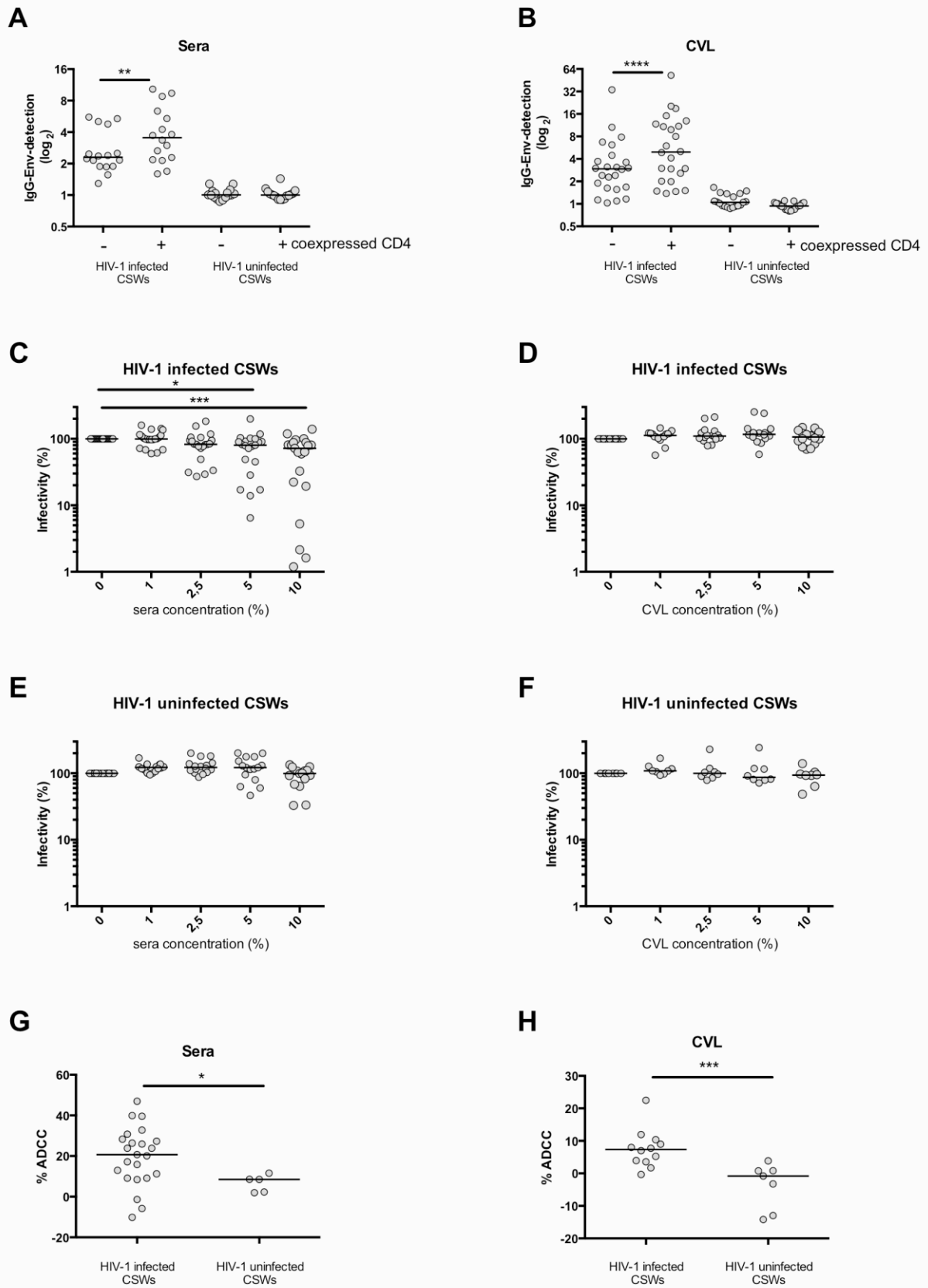


Figure Legend

Figure 1. Anti-IgG-envelope HIV-1 specific antibody detection, neutralization and ADCC by sera and cervico-vaginal lavages from the study population. In both sera and CVLs of HIV-1-positive CSWs, we observed that co-expression of cellular CD4 increased the detection of IgGs. Sera (A) and CVLs (B) from the cohort described in Table 1 was screened by a cell-based ELISA assay for the presence of IgG directed against Env in absence or presence of the co-expressed cellular CD4 receptor. The detection of IgG for each patient was calculated taking the relative luminescence unit (RLU) value for each condition subtracted by the RLU for MLV of each individual. Paired t-tested (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) were used to assess the significance between groups. Sera from HIV-1-positive CSWs but not from HIV-1-negative CSWs neutralized HIV-1. Increasing serum and CVL dilutions from HIV-1-positive CSWs (C-D) or HIV-1-negative CSWs (E-F) were incubated for 1h at 37°C with HIV-1 viral particles bearing the primary clade B (HIV-1_{YU2}) envelope before infection. Sera sample from every individual was also screened with MLV to test the specificity of the reduction of infectivity (not shown). Wilcoxon matched-pairs test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) were used to assess the significance between the different conditions. Sera and CVLs of some HIV-1-positive CSWs were able to mediate elimination of gp120-coated target cells by ADCC. HIV-1-positive CSWs and HIV-1-negative CSWs were screened by serum- (G) and CVL-(H) mediated gp120-coated target CEM-NK cells. ADCC killing was measured using PBMCs from healthy donors as effector cells. Mann Whitney test were used to assess the statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Table 1. Sociodemographic and behavioral characteristics of Beninese sex workers

	HIV-1-uninfected	HIV-1-infected	
	CSWs	CSWs	P-value^a
	N=20	N=23	
Years of sex work	≥ 7	≤ 3	< 0.0001
Age (mean, SD)	40.5 (10.1)	37.9 (8.8)	NS
Clients in the last 7 days (mean, SD)	15.1(14.3)	17.3 (21.0)	NS
Vaginal Douching	100% (20/20)	100% (23/23)	NS
Condom always used in the last 7 days	93.3% (14/15)	95.0% (19/20)	NS

CSW, commercial sex worker; HIV-1, Human Immunodeficiency Virus type 1; N, number of participants; NS: Non significant;

^aP-value; Unpaired t-test for the comparison in between the HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected.

DISCUSSION

Notre hypothèse était que l'immunité naturelle des travailleuses du sexe béninoises séronégatives pourrait être associée à la capacité de l'hôte à produire des facteurs solubles dans leur sang et leur LCV qui confère une protection contre l'infection par le VIH-1.

Or, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent fortement que l'immunité naturelle à l'infection par le VIH-1 au sein de notre cohorte de travailleuses du sexe béninoises ne semble pas être associée à la capacité de l'hôte à produire des facteurs ayant un fort potentiel neutralisant envers le VIH-1, ni à la capacité de l'hôte de produire des IgG spécifiques à l'enveloppe du VIH tel que détecté dans nos essais in vitro.

Travailleuses du sexe séronégatives (TS-)

Premièrement, selon les résultats obtenus par la technique d'ELISA sur base cellulaire, la protection ne semble pas associée à la capacité de l'hôte à produire des IgG spécifiquement contre le trimère de l'enveloppe du VIH dans le sang et la muqueuse vaginale des femmes de notre cohorte. Cette technique d'ELISA sur base cellulaire consiste à détecter des anticorps qui reconnaissent le trimère d'enveloppes matures du VIH-1 exprimées à la surface des cellules (voir article dans annexe 1) (199). À ce jour, de nombreuses études n'ont pas pu détecter des IgG spécifiques à l'enveloppe chez les individus HESN (200-202). Certains de ces groupes ont rapporté avoir détecté des IgG contre le complexe CD4-gp120 et des IgA contre la gp41 dans le plasma des HESN d'une cohorte cambodgienne de couples

sérodiscodants (203). Toutefois, ces essais effectués à l'aide d'ELISA standard diffèrent de l'ELISA sur base cellulaire, car dans cet essai standard les protéines recombinantes de l'enveloppe du VIH sont placées au fond des puits en tant qu'antigènes. Puisqu'il n'existe pas encore de trimère soluble de l'enveloppe, ces essais démontrent la détection d'anticorps qui reconnaissent la forme monomérique de l'enveloppe. Quant à notre étude, elle permet la reconnaissance du complexe hétérotrimérique de l'enveloppe du VIH sous sa forme native. Une autre raison pour laquelle notre technique se différencie des autres est l'usage de l'enveloppe du virus de la leucémie murine (MLV), un contrôle qui permet d'évaluer la spécificité de l'anticorps détecté. Ce contrôle est absent dans ces études (203). À notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la présence d'IgG reconnaissant de façon spécifique le complexe hétérotrimérique des protéines d'enveloppe du VIH-1 chez les individus exposés, mais non infectés.

Les résultats de la figure 1 A-B démontrent l'absence de la détection d'IgG qui sont spécifiques au trimère de l'enveloppe du VIH dans le sérum et le LCV des TS-. L'absence de détection d'IgG qui sont *spécifiques* au trimère de l'enveloppe du VIH ne signifie pas que nos TS- n'ont pas d'IgG qui reconnaît la forme trimérique de l'enveloppe. Puisque notre essai s'est concentré sur la reconnaissance spécifique du trimère de l'enveloppe du VIH, ces résultats signalent plutôt que les TS- de notre cohorte n'ont pas d'IgG qui reconnaît de façon *spécifique* le trimère de l'enveloppe du VIH avec notre essai.

Deuxièmement, avec l'essai de neutralisation, chez certaines TS- nous avons également observé une réduction d'infectivité, qui par contre n'était pas spécifique au VIH, car elles

neutralisaient des particules virales qui avaient une enveloppe hétérologue (MLV). (Figure 1 E-F). Si la protection est un ensemble de facteurs non spécifiques, il est possible que dans notre étude nous ayons observé des facteurs associés à la protection, mais que nous ne les ayons pas détectés parce que nous nous sommes concentrés sur des facteurs spécifiques à l'enveloppe du VIH. Bien que notre étude se soit concentrée sur la possibilité de l'activité neutralisante spécifique des facteurs contenus dans le sérum et le LCV, il y a plusieurs recherches qui soutiennent le rôle de mécanismes de protection alternatifs autres que la neutralisation, tel que l'ADCC (204).

Troisièmement, nous avons évalué la capacité des facteurs contenus dans le sérum et le LCV des TS- à reconnaître et à éliminer des cellules cibles revêtues de gp120 recombinante par ADCC. Cette technique consiste à recouvrir les cellules cibles à l'aide de gp120 recombinante et à évaluer leur élimination par les cellules effectrices, soit des PBMC de donneurs sains mis en contact avec les cellules cibles (voir article dans annexe 2) (205) en présence de sérum et de LCV de TS-. Les résultats démontrent que les anticorps dans le sérum et le LCV des TS- stimulent très peu l'élimination des cellules cibles revêtues de gp120 par ADCC dans notre essai (Figure 1 G - H).

La technique utilisée a peut-être sous estimée l'effet que nous avons observé. Avec d'avantage d'échantillons de sérum et de LCV des femmes de la cohorte, il serait intéressant d'employer des particules virales complètes puisque l'essai ne sollicite que les anticorps qui reconnaissent les épitopes de la gp120. Peut-être que ces TS- reconnaissent d'autres épitopes qui ne sont pas exposés dans notre essai parce que notre essai se limite aux épitopes de la gp120. Peut-être

leurs anticorps reconnaissent-ils la gp41? En outre, le faible pourcentage d'ADCC observé chez les TS- pourrait aussi être expliqué par le niveau de glycosylation du récepteur Fc de l'anticorps qui stimule l'activité d'ADCC. Par exemple, une absence de fucose est associée à une augmentation de l'ADCC des IgG, car des anticorps sans fucose fixent le FcγRIII avec une plus grande affinité (206). Par contre, une augmentation de résidus d'acide sialique sur la portion Fc entraîne une diminution de l'ADCC, car l'acide sialique affecte négativement la liaison du FcγRIIIa (207). Ainsi, le profil de glycosylation du récepteur Fc de l'anticorps peut avoir une grande influence sur sa fonction effectrice (208). Finalement, l'angle d'approche de l'anticorps peut aussi bloquer le recrutement des cellules effectrices.

Bref, toutes nos expériences ont eu pour objectif de trouver des facteurs qui reconnaissent spécifiquement l'enveloppe du VIH. Nous reconnaissons désormais que l'immunité naturelle au VIH pourrait être due à des facteurs non spécifiques. Les autres études qui ont reporté la présence d'IgG spécifiques au VIH n'ont pas démontré la spécificité envers le trimère du VIH. Cela pourrait suggérer que les anticorps associés à la protection ne sont pas spécifiques. Donc, si cela est vrai, ceci pourrait expliquer l'absence de détection d'IgG spécifique à l'enveloppe du VIH chez les TS-.

Pour terminer, il faudrait tenter de détecter des IgA anti-enveloppe dans le sang et le LCV tel que décrit dans d'autres cohortes de sujets HESN (191, 193, 201, 203). De plus, l'identification des IgA1 et des IgA2 dans le sérum et dans le LCV afin de comparer leur ratio avec les IgG de différents isotypes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 pourrait partiellement éclairer certains mécanismes observés. Le ratio d'IgA et d'IgG pourrait être un indicateur de la

compétition entre ces anticorps, ce qui pourrait expliquer les réponses immunes observées. En effet, l'essai vaccinal RV144 a révélé que des niveaux élevés d'IgG qui ciblaient les régions variables V1/V2 de la gp120 étaient associés à une protection contre l'acquisition du VIH-1. Cependant, les IgA1 spécifiques à l'enveloppe du VIH dans le sang atténuaient cet effet protecteur que confère les IgGs puisque les IgGs sont en compétition avec les IgA1 pour la conformation C1 reconnue par l'IgG1 ayant la capacité de médier l'ADCC (166). La spécificité de ces anticorps devrait être également évaluée dans une étude subséquente mais ne devrait pas être un facteur limitant, puisque, tel que mentionné plus haut, la protection pourrait être associée à des facteurs non spécifiques. Les méthodes de prélèvement d'échantillons de la muqueuse vaginale devraient prendre le mucus présent à la surface de la muqueuse, puisque la plupart des anticorps et peptides devraient s'y retrouver (106). D'autres études ont également remarqué que dans les frottis cervicovaginaux (FCV), il y avait plus de chance d'obtenir des anticorps et des peptides antimicrobiens que dans les LCV (209). La purification des IgA dans les sérums et les LCV à l'aide des colonnes de jacaline est une technique fréquemment utilisée dans la littérature pour la détection des IgA chez les HESN qui semble très efficace, particulièrement avec les spécimens de la muqueuse vaginale (193). Ensuite, si la détection d'IgA s'avère positive, les prochaines étapes constitueraient à caractériser cet anticorps, étudier sa fonction et la conformation de l'enveloppe qu'elle reconnaît. Afin de caractériser cet anticorps, il faudrait isoler les cellules B productrices de cet anticorps à l'aide des PBMC, pour ensuite stimuler la ou les cellules B productrices de cet anticorps et créer un cristal. Aussi, la présence d'IgA anti-VIH dans la muqueuse des HESN n'est peut-être pas un facteur de protection naturel universel, puisqu'il n'a pas été retrouvé dans tous les cohortes de HESN (202, 210).

Ainsi, malgré que dans le cadre de notre étude les essais de neutralisation et les essais d'ADCC aient été évalués afin de les corrélés à une protection au sein de notre cohorte, il serait pertinent d'aller au-delà des lignées cellulaires pour ces essais. Trop souvent, l'effet observé dans les lignées cellulaires est sous-estimé comparé à celui observé dans les cellules primaires. L'usage de PBMCs autologue au sérum serait idéal pour les essais de neutralisation et d'ADCC et l'usage de cellules de la muqueuse vaginale autologue au LCV serait pertinent pour les essais de neutralisation et les essais d'ADCC. Les cellules primaires de donneurs sains non infectés ne seraient pas suffisantes pour tirer des conclusions précises sur la capacité *ex vivo* de faire de la neutralisation ou de l'ADCC chez des individus HESN. De même, pour la neutralisation et l'ADCC, il faudrait utiliser un virus fondateur ayant la même enveloppe que celle du virus qui domine la région de provenance des femmes. Comme il est connu que certains individus séropositifs développent des réponses d'anticorps neutralisants qui sont autologues (143, 211), cet ajustement dans la méthodologie serait plus fidèle à ce qui se passe *in vivo*.

En somme, l'immunité naturelle au VIH selon notre étude semble être associée à des facteurs autres que les IgG spécifiques à l'enveloppe du VIH. Plusieurs études soutiennent l'hypothèse que la protection est multifactorielle, d'autant plus qu'il est possible que tous les facteurs associés à l'immunité naturelle ne soient pas universels. Malgré que dans le contexte de cette étude nous n'ayons pas identifié de facteurs associés à la protection, une chose est certaine; la réponse immune de la muqueuse chez les TS- mérite d'être étudiée en profondeur afin de mieux comprendre cette absence d'infection malgré cette forte exposition.

Travailleuses du sexe séropositives (TS+)

Malgré que notre étude porte premièrement sur des facteurs associés à la protection au VIH contenus dans le sérum et le LCV, nous avons obtenu des résultats très intéressants chez les TS+.

Tout d'abord, tel qu'attendu, les résultats obtenus par ELISA sur base cellulaire (voir article annexe 1) qui sont illustrés à la figure 1 A-B démontrent que les TS+ ont la capacité de développer des IgG spécifiques à l'enveloppe du VIH qui détectent l'enveloppe trimérique dans le sérum et le LCV. Une grande majorité de ces TS+ produisent des anticorps qui ont une meilleure reconnaissance de l'enveloppe dans sa forme lié à CD4 dans le sérum et le LCV. Cela suggère que ces femmes avaient des anticorps de type CD4i. Or, la présence de cette catégorie d'anticorps n'a jamais été démontrée dans le LCV de TS+. Ce résultat inattendu, mais très révélateur, nous montre pour la première fois une des conformations de l'enveloppe qui est favorisée pour la reconnaissance des anticorps présents au site principal de transmission.

Ensuite, afin d'évaluer le potentiel de neutralisation envers le VIH-1 de ces IgG ainsi que celui des autres facteurs contenus dans le LCV et le sérum des TS+, nous avons effectué un essai de neutralisation. Plusieurs des TS+ avaient la capacité de réduire l'infectivité du VIH dans le sérum, mais uniquement une faible minorité avait la capacité de réduire l'infectivité de façon spécifique et significative dans leur sérum. (Figure 1 C).

Parmi les femmes étudiées dans notre cohorte, les résultats d'une femme en particulier ont attiré notre attention : la TS+ 341, chez qui nous avons détecté des IgG spécifiques à l'enveloppe du VIH dans le sérum. Nous avons aussi observé la capacité des facteurs contenus dans son sérum à réduire l'infectivité des particules virales exprimant l'enveloppe du clade B de façon très significative et spécifique. Cette TS+ était également capable de réduire l'infectivité d'un virus qui exprimait une enveloppe de clade C. Malheureusement, les échantillons de PBMCs de cette femme ne sont pas disponibles pour confirmer et caractériser le ou les anticorps responsables de cette activité. Par contre, dans le LCV, nous avons observé très peu de réduction d'infectivité qui était spécifique au VIH (Figure 1 D). Cela suggère donc qu'une minorité de TS+ avait des anticorps neutralisant spécifiques au VIH dans leur sérum, et que dans leur LCV, malgré la détection d'anticorps dirigés contre l'enveloppe du VIH, il n'y avait presque pas de réduction d'infectivité spécifique au VIH.

Finalement, nous avons évalué la capacité des facteurs contenus dans le sérum et le LCV des TS+ à éliminer des cellules cibles revêtues de gp120 recombinante par ADCC (voir article dans annexe 2) (205). Les résultats démontrent que les anticorps dans le sérum et le LCV de plusieurs TS+ stimulent l'élimination des cellules cibles revêtues de gp120 par ADCC dans notre essai (Figure 1 G - H).

Bref, nos résultats démontrent pour la première fois que les IgG spécifiques à l'enveloppe du VIH dans le LCV préfèrent lier l'enveloppe lorsqu'elle est liée au CD4. Ces IgG pourraient être impliquées dans l'élimination par ADCC de cellules cibles infectées au site de transmission. Les IgG sont bien reconnues pour leur capacité à induire cette réponse (205,

212). Certes, dans le LCV, le pourcentage d'ADCC est plus faible que dans le sérum, par contre ces deux compartiments et leurs contenus sont complètement différents. Par conséquent, les niveaux d'ADCC ne peuvent pas être comparés. Ceci dit, l'effet observé par cette technique utilisant de la gp120 recombinante monomérique est probablement sous-estimé comparé à l'effet qui pourrait être observé avec un essai utilisant des particules virales complètes exprimant l'enveloppe du clade local au Bénin avec des cellules primaires.

Parmi les femmes étudiées dans notre cohorte, les échantillons de sérum et de LCV de la TS+ 341, mentionnée précédemment, se sont démarqués des autres. Ils constituent un exemple de la diversité des réponses immunes au sein d'un individu dans les différents compartiments de l'organisme pour combattre une infection. Un individu peut avoir des IgG neutralisants et non neutralisants dans le même compartiment sans que cela ne puisse prédire le type de réponse anti-VIH entamée. Il est important de prendre en compte les autres facteurs dans l'environnement qui peuvent atténuer ou empêcher la réponse immunitaire souhaitée. Malgré que cette TS+ avait des anticorps similaires aux anticorps CD4i dans son sérum, nous n'avons pas observé d'activité qui induisait une réponse ADCC. Ceci pourrait suggérer une plus forte concentration d'IgA1 dans le sérum, ce qui pourrait bloquer l'activité ADCC par la compétition avec le récepteur Fc.

Il serait possible d'entamer plusieurs pistes dans le but de poursuivre l'étude sur la réponse immune des TS+. En dépit de la neutralisation et/ou l'activité ADCC anti-VIH qui ont été retrouvées chez presque toutes les TS+ dans le cadre de notre étude, la présence d'anticorps similaires aux CD4i a été détectée dans le sérum et dans le LCV de toutes les femmes. Cela

montre qu'au cours d'une infection par le VIH, malgré le fait que l'activité ADCC et neutralisante induite par les IgG peut varier d'un individu à l'autre, la génération des anticorps CD4i se fait chez la plupart des individus séropositifs (213). Conséquemment, la génération de ces anticorps chez l'hôte sain pourrait être une piste pour une stratégie prophylactique contre le VIH, surtout au site principal de transmission. Par contre, afin de générer ce type d'anticorps, il faudrait un immunogène qui expose le site de liaison des anticorps CD4i. Or, des équipes de recherches ont réussi à développer de petits composés qui peuvent stabiliser l'enveloppe du VIH dans une conformation qui permet sa reconnaissance par les anticorps CD4i (214). Ces composés sont : le DMJ-I-228 et le DMJ-II-121. Les molécules DMJ imitent le CD4 en se liant à la gp120, ce qui prévient la liaison au récepteur CD4. Donc, les DMJ préviennent l'infection par le VIH en bloquant l'entrée du virus. De plus, la liaison des composés DMJ fixe l'enveloppe dans une conformation qui suscite la reconnaissance par les anticorps CD4i tels que le 17b (214).

Pour les expériences futures, premièrement, il serait important d'évaluer la capacité des anticorps polyclonaux contenus dans le sérum et dans le LCV de TS+ à reconnaître la conformation de l'enveloppe induite par les composés DMJ. Par la suite, il serait intéressant d'évaluer la capacité de ces anticorps, similaires aux CD4i, à stimuler des activités neutralisantes, ADCC ou autres, dans le sérum et le LCV de TS+, afin de déterminer si ces composés pourraient jouer un rôle dans la protection contre le VIH chez les individus séropositifs, mais surtout dans la muqueuse vaginale.

Un autre facteur qui pourrait jouer un rôle dans la protection contre le VIH aux muqueuses est l'affinité de la portion Fc de l'IgG pour le FcRn. Il a été démontré que certaines mutations dans la portion Fc d'une IgG augmentent son affinité pour le FcRn et le FcγRIIIa (215). L'augmentation de l'affinité du FcRn par les IgGs est bénéfique puisqu'elle a pour effet d'augmenter la transcytose des IgGs dans les muqueuses *in vitro*, elle augmente la demi-vie des IgG, ce qui rallonge leur présence dans la muqueuse tout en gardant la reconnaissance et l'activité antivirale (ADCC et neutralisation) des IgG intactes (215). Ces études démontrent que l'affinité des IgGs pour le FcRn et le FcγRIIIa sont des facteurs à prendre en considération lors de la conception de traitements préventifs ou thérapeutiques car ils peuvent avoir un grand impact sur l'efficacité du traitement de l'infection aux muqueuses.

En somme, chez les TS+, la réduction d'infectivité observée dans le sérum semble liée aux IgG, qui semblent être CD4i. De plus, l'activité ADCC observée dans le sérum et le LCV semble être liée aux IgG spécifiques à l'enveloppe et qui reconnaissent mieux la conformation de l'enveloppe lorsqu'elle est liée au CD4.

Conclusion

Puisque la controverse existe toujours sur la présence d'IgG spécifiques au VIH chez les HESN, cette étude soutient et confirme les résultats des autres équipes qui n'ont pas trouvé d'IgG spécifiques au VIH ni d'activité neutralisante. Notre étude démontre pour la première fois à notre connaissance la capacité des TS+ à éliminer des cellules cibles par une réponse ADCC dans leur sérum et dans leur LCV.

De plus, nous avons des résultats qui peuvent servir de pistes pour les futurs essais vaccinaux, puisque nous avons identifié une conformation de l'enveloppe qui est mieux reconnue par les IgG spécifiques au VIH dans la muqueuse vaginale et ces dernières pourraient être impliquées dans l'élimination des cellules infectées par ADCC dans la muqueuse vaginale.

Pour conclure, l'étude d'individus qui présentent une immunité naturelle au VIH est cruciale pour le développement d'une réponse protectrice chez l'hôte. Ces études ont le potentiel d'identifier de nouveaux facteurs qui pourraient servir à développer de nouvelles pistes préventives et/ou thérapeutiques contre le VIH-1. Il faut donc continuer à faire avancer ces études et un jour peut-être que l'objectif ultime sera atteint.

Bibliographie

1. 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(4599):868-71.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):865-7.
3. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine*. 1981;305(24):1425-31.
4. WHO-HIV/AIDS. Fact Sheet No360 : Key facts Genève, Suisse: World Health Organization; July 2014. [modifié le; cité le 11 Novembre 2014]. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>
5. UNAIDSreport. UNAIDS report shows that 19 million of the 35 million people living with HIV today do not know that they have the virus [Press release]. Genève, Suisse: UNAIDS; 2014. [modifié le 16 Juillet 2014; cité le 12 Novembre 2014]. Disponible: <http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2014/july/20140716prgapreport>
6. ONUSIDA. RAPPORT ONUSIDA: 2011. [modifié le; cité le July 27, 2014]. Disponible: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_fr.pdf
7. UNAIDS. The Gap Report Genève, Suisse: UNAIDS; 2014. [modifié le Juillet 2014; cité le 11 Novembre 2014]. Disponible: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_Gap_report_en.pdf
8. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(24):13193-7.
9. Archin NM, Margolis DM. Emerging strategies to deplete the HIV reservoir. *Current opinion in infectious diseases*. 2014;27(1):29-35.
10. DeChristopher BA, Loy BA, Marsden MD, Schrier AJ, Zack JA, Wender PA. Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs in vitro. *Nature chemistry*. 2012;4(9):705-10.
11. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature medicine*. 1995;1(12):1284-90.
12. UNAIDS. Fact sheet : Global Statistics Genève Suisse: UNAIDS; 2014. [modifié le; cité le 11 Novembre 2014]. Disponible: <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/2014/2014gapreport/factsheet>
13. Collier L, Oxford JS. *Virologie humaine*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 2004.

14. Freed EO, Martin MA. Fields virology. Dans: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., rédacteurs. Human Immunodeficiency Viruses: Replication; HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. 6th edition. éd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. p.1503-83.
15. 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(4761):343-6.
16. Kurth R, Bannert R. Retroviruses : molecular biology, genomics and pathogenesis. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2010.
17. Sharp PM, Robertson DL, Hahn BH. Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1995;349(1327):41-7.
18. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 2000;287(5453):607-14.
19. 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(6718):436-41.
20. Paiardini M, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses. *Annual review of medicine*. 2009;60:485-95.
21. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 1989;339(6223):389-92.
22. Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *Aids*. 1993;7(6):769-80.
23. Myers G. Tenth anniversary perspectives on AIDS. HIV: between past and future. *AIDS research and human retroviruses*. 1994;10(11):1317-24.
24. Louwagie J, Janssens W, Mascola J, Heyndrickx L, Hegerich P, van der Groen G, et al. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *Journal of virology*. 1995;69(1):263-71.
25. Subbarao S, Schochetman G. Genetic variability of HIV-1. *Aids*. 1996;10 Suppl A:S13-23.
26. Foley B, Leitner T, Apetrei C, Hahn B, Mizrahi I, Mullins J, et al. HIV Sequence Compendium 2013 [En ligne]. Los Alamos, Nouveau-Mexique: Los Alamos, National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics; 2013. HIV-1/SIVcpz Complete Genomes [modifié le; cité le 8 aout 2014]; [LA-UR-13-26007]. Disponible: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2013/sequence2013.pdf>
27. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(3):182-92.
28. Chamberland A, Diabate S, Sylla M, Anagounou S, Geraldo N, Zannou DM, et al. Transmission of HIV-1 drug resistance in Benin could jeopardise future treatment options. *Sexually transmitted infections*. 2012;88(3):179-83.
29. Fleury HJA. Virologie humaine. 5e éd. éd. Issy-les-Moulineaux, France: Elsevier Masson; 2009.
30. Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell host & microbe*. 2008;3(6):388-98.

31. Strebel K. HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Current opinion in virology*. 2013;3(6):692-9.
32. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(21):7552-7.
33. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, et al. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(6):1273-89.
34. 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. *The Journal of cell biology*. 2000;151(2):413-23.
35. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*. 2010;7:96.
36. Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(10).
37. Di Nunzio F. New insights in the role of nucleoporins: a bridge leading to concerted steps from HIV-1 nuclear entry until integration. *Virus research*. 2013;178(2):187-96.
38. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(7):a006890.
39. Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS pathogens*. 2008;4(3):e1000046.
40. Freed EO. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics*. 2001;26(1-6):13-33.
41. Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W. Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science*. 1985;229(4708):74-7.
42. Rittner K, Churcher MJ, Gait MJ, Karn J. The human immunodeficiency virus long terminal repeat includes a specialised initiator element which is required for Tat-responsive transcription. *Journal of molecular biology*. 1995;248(3):562-80.
43. Selby MJ, Bain ES, Luciw PA, Peterlin BM. Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes & development*. 1989;3(4):547-58.
44. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(2):a006916.
45. Stoltzfus CM. Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Advances in virus research*. 2009;74:1-40.
46. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature*. 1986;321(6068):412-7.
47. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 1989;338(6212):254-7.

48. Daly TJ, Cook KS, Gray GS, Maione TE, Rusche JR. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature*. 1989;342(6251):816-9.
49. Heaphy S, Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Karn J, et al. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell*. 1990;60(4):685-93.
50. Mann DA, Mikaelian I, Zimmel RW, Green SM, Lowe AD, Kimura T, et al. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *Journal of molecular biology*. 1994;241(2):193-207.
51. Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *Journal of virology*. 1990;64(11):5448-56.
52. Allan JS, Coligan JE, Barin F, McLane MF, Sodroski JG, Rosen CA, et al. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science*. 1985;228(4703):1091-4.
53. Robey WG, Safai B, Oroszlan S, Arthur LO, Gonda MA, Gallo RC, et al. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science*. 1985;228(4699):593-5.
54. 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(6402):358-61.
55. Moulard M, Decroly E. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1469(3):121-32.
56. Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO. Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(41):14889-94.
57. Finzi A, Orthwein A, Mercier J, Cohen EA. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *Journal of virology*. 2007;81(14):7476-90.
58. UNAIDS. Getting to zero : 2011–2015 Strategy joint united nations programme on HIV/AIDS Genève, Suisse: (UNAIDS); 2010. [modifié le; cité le 28juin2014]. Disponible: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2010/jc2034_unaids_strategy_en.pdf
59. Kresina TF, Mathieson B. Human immunodeficiency virus type 1 infection, mucosal immunity, and pathogenesis and extramural research programs at the National Institutes of Health. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179 Suppl 3:S392-6.
60. Overbaugh J, Kreiss J, Poss M, Lewis P, Mostad S, John G, et al. Studies of human immunodeficiency virus type 1 mucosal viral shedding and transmission in Kenya. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179 Suppl 3:S401-4.
61. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*. 2010;464(7286):217-23.
62. Keele BF, Estes JD. Barriers to mucosal transmission of immunodeficiency viruses. *Blood*. 2011;118(4):839-46.

63. Barnett T, Whiteside A. AIDS in the twenty-first century : disease and globalization. 2nde éd. New York: Palgrave Macmillan; 2006.
64. Bushman FD, Nabel GJ, Swanstrom R. HIV : from biology to prevention and treatment. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
65. Miller CJ, Alexander NJ, Sutjipto S, Lackner AA, Gettie A, Hendrickx AG, et al. Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 1989;63(10):4277-84.
66. Miller CJ, Alexander NJ, Vogel P, Anderson J, Marx PA. Mechanism of genital transmission of SIV: a hypothesis based on transmission studies and the location of SIV in the genital tract of chronically infected female rhesus macaques. *Journal of medical primatology*. 1992;21(2-3):64-8.
67. Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annual review of medicine*. 2011;62:127-39.
68. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *Journal of virology*. 2000;74(13):6087-95.
69. Carias AM, McCoombe S, McRaven M, Anderson M, Galloway N, Vandergrift N, et al. Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *Journal of virology*. 2013;87(21):11388-400.
70. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 2005;79(14):9217-27.
71. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*. 1999;286(5443):1353-7.
72. Lackner AA, Veazey RS. Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annual review of medicine*. 2007;58:461-76.
73. Hladik F, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Current HIV/AIDS reports*. 2009;6(1):20-8.
74. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*. 2007;26(2):257-70.
75. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology*. 2011;6:223-48.
76. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(6):761-70.
77. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annual review of immunology*. 1999;17:625-56.
78. Marcello A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*. 2006;3:7.
79. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2011;1(1):a007096.

80. Schneider E, Whitmore S, Glynn MK, Dominguez K, Mitsch A, McKenna MT. Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to <13 Years -- United States, 2008. December 5, 2008 2008. Contrat No.: 8 AOUT 2014.
81. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Tartar A, Portetelle D, Burny A, et al. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions. *Science*. 1986;231(4745):1549-53.
82. Huthoff H, Malim MH. Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology*. 2005;334(2):147-53.
83. Malim MH. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2009;364(1517):675-87.
84. Cohen EA. From arrest to escape: HIV-1 Vpr cuts a deal. *Cell host & microbe*. 2014;15(2):125-7.
85. Richard J, Sindhu S, Pham TN, Belzile JP, Cohen EA. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood*. 2010;115(7):1354-63.
86. Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science*. 1988;241(4870):1221-3.
87. Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*. 1988;334(6182):532-4.
88. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of virology*. 1992;66(12):7193-200.
89. Wildum S, Schindler M, Munch J, Kirchhoff F. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *Journal of virology*. 2006;80(16):8047-59.
90. Binette J, Dube M, Mercier J, Halawani D, Latterich M, Cohen EA. Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. *Retrovirology*. 2007;4:75.
91. Magadan JG, Perez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strebel K, Bonifacino JS. Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. *PLoS pathogens*. 2010;6(4):e1000869.
92. Venkatesh S, Bieniasz PD. Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. *PLoS pathogens*. 2013;9(7):e1003483.
93. Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, Gharsallah NE, Coutu M, Baalwa J, et al. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of virology*. 2014;88(5):2633-44.
94. Schwartz O, Dautry-Varsat A, Goud B, Marechal V, Subtil A, Heard JM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *Journal of virology*. 1995;69(1):528-33.
95. Kirchhoff F. Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell host & microbe*. 2010;8(1):55-67.

96. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, et al. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*. 1999;10(6):661-71.
97. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1998;391(6665):397-401.
98. Chaudhuri R, Lindwasser OW, Smith WJ, Hurley JH, Bonifacino JS. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *Journal of virology*. 2007;81(8):3877-90.
99. UNAIDS. Fact sheet: Adolescents, young people and HIV San Fransisco: UNAIDS; April 17, 2012. [modifié le; cité le 25 juin 2014]. Disponible: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2012/20120417_FS_adolescentsyoungpeoplehiv_en.pdf
100. UNAIDS. UNAIDS World AIDS Day Report | 2012 Genève, Suisse: 2012. [modifié le; cité le]. Disponible: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/jc2434_worldaidsday_results_en.pdf
101. Albertyn C. Using Rights and the Law to Reduce Women's Vulnerability to HIV/AIDS Johannesburg, South Africa: Canadian HIV/AIDS Legal Network and the AIDS Law Project; 2000. [modifié le; cité le 13 aout 2014]. Disponible: <http://www.aidslaw.ca/publications/interfaces/downloadFile.php?ref=372>
102. Holmqvist G. HIV and income inequality: if there is a link, what does it tell us? Brazil: paper IPCfIGUw; 2009.Rapport no.: Report No.: 54.
103. Mehta SD, Moses S, Agot K, Odoyo-June E, Li H, Maclean I, et al. The long term efficacy of medical male circumcision against HIV acquisition. *Aids*. 2013.
104. Richardson ET, Collins SE, Kung T, Jones JH, Hoan Tram K, Boggiano VL, et al. Gender inequality and HIV transmission: a global analysis. *Journal of the International AIDS Society*. 2014;17:19035.
105. Gilgen D, Campbell C, Williams B, Taljaard D, MacPhail C. The natural history of HIV/AIDS in South Africa: a biomedical and social survey in Carletonville. Johannesburg, South Africa.: Council for Scientific and Industrial Research; 2000.
106. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(2):185-94.
107. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
108. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology*. Fourth edition.e éd. New York: Garland Science; 2014.
109. Janeway C. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6the éd. New York: Garland Science; 2005.
110. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, et al. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biology of reproduction*. 1997;56(4):999-1011.

111. Elstein M. Functions and physical properties of mucus in the female genital tract. *British medical bulletin*. 1978;34(1):83-8.
112. Shukair SA, Allen SA, Cianci GC, Stieh DJ, Anderson MR, Baig SM, et al. Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement. *Mucosal immunology*. 2013;6(2):427-34.
113. Mane A, Kulkarni S, Ghate M, Risbud A, Thakar M. HIV-1 RNA shedding in the female genital tract is associated with reduced quantity of Lactobacilli in clinically asymptomatic HIV-positive women. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;75(1):112-4.
114. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital-tract HIV load correlates inversely with Lactobacillus species but positively with bacterial vaginosis and Mycoplasma hominis. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(1):25-32.
115. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS one*. 2013;8(11):e80074.
116. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4680-7.
117. Lai SK, Hida K, Shukair S, Wang YY, Figueiredo A, Cone R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *Journal of virology*. 2009;83(21):11196-200.
118. Wira CR, Patel MV, Ghosh M, Mukura L, Fahey JV. Innate immunity in the human female reproductive tract: endocrine regulation of endogenous antimicrobial protection against HIV and other sexually transmitted infections. *American journal of reproductive immunology*. 2011;65(3):196-211.
119. Amjadi F, Salehi E, Mehdizadeh M, Aflatoonian R. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Advanced biomedical research*. 2014;3:1.
120. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998;391(6664):240.
121. Drannik AG, Nag K, Sallenave JM, Rosenthal KL. Antiviral activity of trappin-2 and elafin in vitro and in vivo against genital herpes. *Journal of virology*. 2013;87(13):7526-38.
122. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR. Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *Journal of reproductive immunology*. 2013;97(1):74-84.
123. Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(6):447-56.
124. Chang TL, Klotman ME. Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS reviews*. 2004;6(3):161-8.
125. Selsted ME, Ouellette AJ. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends in cell biology*. 1995;5(3):114-9.
126. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature immunology*. 2005;6(6):551-7.
127. Mselle TF, Howell AL, Ghosh M, Wira CR, Sentman CL. Human uterine natural killer cells but not blood natural killer cells inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection by secretion of CXCL12. *Journal of virology*. 2009;83(21):11188-95.

128. Fuchs A, Colonna M. Natural killer (NK) and NK-like cells at mucosal epithelia: Mediators of anti-microbial defense and maintenance of tissue integrity. *European journal of microbiology & immunology*. 2011;1(4):257-66.
129. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*. Paris: Dunod; 2008.
130. Moir S, Fauci AS. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunological reviews*. 2013;254(1):207-24.
131. Burrer R, Haessig-Einius S, Aubertin AM, Moog C. Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology*. 2005;333(1):102-13.
132. Klasse PJ, Sattentau QJ. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 9):2091-108.
133. Hangartner L, Zellweger RM, Giobbi M, Weber J, Eschli B, McCoy KD, et al. Nonneutralizing antibodies binding to the surface glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus reduce early virus spread. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(8):2033-42.
134. Blue CE, Spiller OB, Blackbourn DJ. The relevance of complement to virus biology. *Virology*. 2004;319(2):176-84.
135. Sullivan DA, Wira CR. Hormonal regulation of immunoglobulins in the rat uterus: uterine response to multiple estradiol treatments. *Endocrinology*. 1984;114(2):650-8.
136. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Patel M, Fahey JV. The Role of Sex Hormones and the Tissue Environment in Immune Protection Against HIV in the Female Reproductive Tract. *American journal of reproductive immunology*. 2014;72(2):171-81.
137. Yoo EM, Morrison SL. IgA: an immune glycoprotein. *Clinical immunology*. 2005;116(1):3-10.
138. 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. *Journal of immunology*. 2001;166(10):6257-65.
139. van Egmond M, Damen CA, van Spriël AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends in immunology*. 2001;22(4):205-11.
140. Li Z, Palaniyandi S, Zeng R, Tuo W, Roopenian DC, Zhu X. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(11):4388-93.
141. Ward ES, Ober RJ. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn. *Advances in immunology*. 2009;103:77-115.
142. Crooks ET, Moore PL, Franti M, Cayan CS, Zhu P, Jiang P, et al. A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology*. 2007;366(2):245-62.
143. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *Journal of virology*. 2008;82(24):12449-63.

144. Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nature medicine*. 2009;15(8):866-70.
145. Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994;266(5187):1024-7.
146. 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(5950):285-9.
147. 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. *Journal of virology*. 1996;70(2):1100-8.
148. Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, et al. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *Journal of virology*. 1994;68(6):4031-4.
149. 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 research and human retroviruses*. 2001;17(18):1757-65.
150. Blattner C, Lee JH, Sliепен K, Derking R, Falkowska E, de la Pena AT, et al. Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 Env trimers. *Immunity*. 2014;40(5):669-80.
151. Falkowska E, Le KM, Ramos A, Doores KJ, Lee JH, Blattner C, et al. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. *Immunity*. 2014;40(5):657-68.
152. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(1):11-23.
153. Burton DR, Weiss RA. AIDS/HIV. A boost for HIV vaccine design. *Science*. 2010;329(5993):770-3.
154. Mascola JR, Haynes BF. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunological reviews*. 2013;254(1):225-44.
155. Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Pazgier M, Haynes BF, Ferrari G. Epitope specificity of human immunodeficiency virus-1 antibody dependent cellular cytotoxicity [ADCC] responses. *Current HIV research*. 2013;11(5):378-87.
156. Guan Y, Pazgier M, Sajadi MM, Kamin-Lewis R, Al-Darmarki S, Flinko R, et al. Diverse specificity and effector function among human antibodies to HIV-1 envelope glycoprotein epitopes exposed by CD4 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(1):E69-78.
157. Lyerly HK, Reed DL, Matthews TJ, Langlois AJ, Ahearne PA, Petteway SR, Jr., et al. Anti-GP 120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC. *AIDS research and human retroviruses*. 1987;3(4):409-22.

158. Koup RA, Sullivan JL, Levine PH, Brewster F, Mahr A, Mazzara G, et al. Antigenic specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed against human immunodeficiency virus in antibody-positive sera. *Journal of virology*. 1989;63(2):584-90.
159. Forthal DN, Landucci G, Daar ES. Antibody from patients with acute human immunodeficiency virus (HIV) infection inhibits primary strains of HIV type 1 in the presence of natural-killer effector cells. *Journal of virology*. 2001;75(15):6953-61.
160. Chung AW, Navis M, Isitman G, Centre R, Finlayson R, Bloch M, et al. Activation of NK cells by ADCC responses during early HIV infection. *Viral immunology*. 2011;24(2):171-5.
161. Chung AW, Isitman G, Navis M, Kramski M, Center RJ, Kent SJ, et al. Immune escape from HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(18):7505-10.
162. 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. *The New England journal of medicine*. 2012;366(14):1275-86.
163. Liao HX, Bonsignori M, Alam SM, McLellan JS, Tomaras GD, Moody MA, et al. Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. *Immunity*. 2013;38(1):176-86.
164. Karnasuta C, Paris RM, Cox JH, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Thongcharoen P, et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic responses in participants enrolled in a phase I/II ALVAC-HIV/AIDS VAX B/E prime-boost HIV-1 vaccine trial in Thailand. *Vaccine*. 2005;23(19):2522-9.
165. Goepfert PA, Tomaras GD, Horton H, Montefiori D, Ferrari G, Deers M, et al. Durable HIV-1 antibody and T-cell responses elicited by an adjuvanted multi-protein recombinant vaccine in uninfected human volunteers. *Vaccine*. 2007;25(3):510-8.
166. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(22):9019-24.
167. 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(5996):763-7.
168. 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(5996):767-8.
169. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996;85(7):1135-48.
170. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381(6584):661-6.
171. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996;381(6584):667-73.

172. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(3):1166-71.
173. 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(6686):648-59.
174. Finzi A, Xiang SH, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, et al. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Molecular cell*. 2010;37(5):656-67. Epub 2010/03/17.
175. Desormeaux A, Coutu M, Medjahed H, Pacheco B, Herschhorn A, Gu C, et al. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *Journal of virology*. 2013;87(5):2549-62.
176. Ferrari G, Pollara J, Kozink D, Harms T, Drinker M, Freel S, et al. An HIV-1 gp120 envelope human monoclonal antibody that recognizes a C1 conformational epitope mediates potent antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity and defines a common ADCC epitope in human HIV-1 serum. *Journal of virology*. 2011;85(14):7029-36.
177. Acharya P, Tolbert WD, Gohain N, Wu X, Yu L, Liu T, et al. Structural Definition of an Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Response Implicated in Reduced Risk for HIV-1 Infection. *Journal of virology*. 2014.
178. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996;348(9038):1347-51.
179. Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, Gotch F, Ariyoshi K, Hallam N, et al. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet*. 1993;341(8849):860-1.
180. Card CM, Ball TB, Fowke KR. Immune Quiescence: a model of protection against HIV infection. *Retrovirology*. 2013;10(1):141.
181. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:875821.
182. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal immunology*. 2008;1(4):309-16.
183. Yao XD, Omenge RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, et al. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal immunology*. 2014;7(2):268-79.
184. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(1):90-8.
185. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995;270(5243):1811-5.

186. Eberhard A, Ponceau B, Biron F, Verrier B. [Mechanisms of resistance to sexual transmission of HIV-1]. *Medecine et maladies infectieuses*. 2005;35(11):517-24. Les mecanismes de resistance a la transmission sexuelle du VIH-1.
187. Colobran R, Adreani P, Ashhab Y, Llano A, Este JA, Dominguez O, et al. Multiple products derived from two CCL4 loci: high incidence of a new polymorphism in HIV+ patients. *Journal of immunology*. 2005;174(9):5655-64.
188. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*. 2005;307(5714):1434-40.
189. Koning FA, Jansen CA, Dekker J, Kaslow RA, Dukers N, van Baarle D, et al. Correlates of resistance to HIV-1 infection in homosexual men with high-risk sexual behaviour. *Aids*. 2004;18(8):1117-26.
190. Fowke KR, Kaul R, Rosenthal KL, Oyugi J, Kimani J, Rutherford WJ, et al. HIV-1-specific cellular immune responses among HIV-1-resistant sex workers. *Immunology and cell biology*. 2000;78(6):586-95.
191. Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Ble C, Meacci F, et al. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nature medicine*. 1997;3(11):1250-7.
192. 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(17):2155-63.
193. 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. *Journal of immunology*. 2000;165(9):5170-6.
194. Trabattoni D, Biasin M, Clerici M. Mucosal immunoglobulin A in HIV-exposed seronegative individuals. *Aids*. 2012;26(17):2247-50.
195. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.
196. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722-5.
197. Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, et al. The deltaccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human molecular genetics*. 1998;7(3):399-406.
198. Lopalco L, Barassi C, Paolucci C, Breda D, Brunelli D, Nguyen M, et al. Predictive value of anti-cell and anti-human immunodeficiency virus (HIV) humoral responses in HIV-1-exposed seronegative cohorts of European and Asian origin. *The Journal of general virology*. 2005;86(Pt 2):339-48.
199. Veillette M, Coutu M, Richard J, Batraverse LA, Désormeaux A, Roger M, et al. Conformational Evaluation of HIV-1 Trimeric Envelope Glycoproteins Using a Cell-Based ELISA Assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2014(e51995).
200. 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(9):1117-22.

201. 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(1):23-9.
202. 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 research and human retroviruses*. 2011;27(5):469-86.
203. 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. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2006;42(4):412-9.
204. Forthal DN, Moog C. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2009;4(5):388-93.
205. Richard J, Veillette M, Batraverse L-A, Coutu M, Bonsignori M, Bernard N, et al. Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. In press. 2014.
206. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(30):26733-40.
207. Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN, Raju TS. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular immunology*. 2007;44(7):1524-34.
208. Peipp M, Lammerts van Bueren JJ, Schneider-Merck T, Bleeker WW, Dechant M, Beyer T, et al. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*. 2008;112(6):2390-9.
209. 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 research and human retroviruses*. 2009;25(1):83-92.
210. Fiore JR, Laddago V, Lepera A, La Grasta L, Di Stefano M, Saracino A, et al. Limited secretory-IgA response in cervicovaginal secretions from HIV-1 infected, but not high risk seronegative women: lack of correlation to genital viral shedding. *The new microbiologica*. 2000;23(1):85-92.
211. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422(6929):307-12.
212. Ljunggren K, Broliden PA, Morfeldt-Manson L, Jondal M, Wahren B. IgG subclass response to HIV in relation to antibody-dependent cellular cytotoxicity at different clinical stages. *Clinical and experimental immunology*. 1988;73(3):343-7.
213. Decker JM, Bibollet-Ruche F, Wei X, Wang S, Levy DN, Wang W, et al. Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(9):1407-19.
214. Madani N, Princiotta AM, Schon A, LaLonde J, Feng Y, Freire E, et al. CD4-Mimetic Small Molecules Sensitize Human Immunodeficiency Virus to Vaccine-Elicited Antibodies. *Journal of virology*. 2014;88(12):6542-55.

215. Ko SY, Pegu A, Rudicell RS, Yang ZY, Joyce MG, Chen X, et al. Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection. *Nature*. 2014.

Annexe 1 :

Conformational Evaluation of HIV-1 Trimeric Envelope Glycoproteins Using a Cell-Based ELISA Assay

Cet article a été publié dans le journal : The Journal of Visualized Experiments (JoVE)

Contribution des co-auteurs :

Mathieu Coutu, Jonathan Richard et Laurie-Anne Batrville ont contribué de façon égale à ce travail. Andrés Finzi et Michel Roger ont contribué à l'élaboration des plans de l'étude. Anik Désormeaux a participé au développement et à l'optimisation de la technique. Maxime Veillette et Jonathan Richard ont réalisé la figure 1. Jonathan Richard a réalisé les expériences d'ELISA sur base cellulaire pour la figure 2. Mathieu Coutu a réalisé les expériences d'ELISA sur base cellulaire pour la figure 3 (a et b) et a participé à la génération de l'anticorps A32 et à la protéine de CD4 soluble. Laurie-Anne Batrville a réalisé les expériences d'ELISA sur base cellulaire pour la figure 4 (a et b). Andrés Finzi est le chercheur principal du projet. L'article a été rédigé par Maxime Veillette et Andrés Finzi.

Conformational Evaluation of HIV-1 Trimeric Envelope Glycoproteins Using a Cell-Based ELISA Assay

Authors:

Veillette, Maxime
Centre de recherche du CHUM
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology
Université de Montréal
Montreal, Canada

Coutu, Mathieu*
Centre de recherche du CHUM
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology
Université de Montréal
Montreal, Canada

Richard, Jonathan*
Centre de recherche du CHUM
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology
Université de Montréal
Montreal, Canada

Batraville, Laurie-Anne* Centre
de recherche du CHUM
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology
Université de Montréal
Montreal, Canada

Désormeaux, Anik
Centre de recherche du CHUM
Montreal, Canada

Michel Roger
Centre de recherche du CHUM
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology
Université de Montréal

Finzi, Andrés
Centre de recherche du CHUM
Department of Microbiology, Infectiology and Immunology
Université de Montréal
Montreal, Canada

* Contributed equally to this work

Corresponding author:

Andrés Finzi

Centre de recherche du CHUM (CRCHUM)

Key Words: HIV-1, envelope glycoproteins, gp120, gp41, neutralizing antibodies, non-neutralizing antibodies, CD4, cell-based ELISA.

Short abstract

Understanding viral surface antigens conformations is required to evaluate antibody neutralization and guide the design of effective vaccine immunogens. Here we describe a cell-based ELISA assay that allows the study of the recognition of trimeric HIV-1 Env expressed at the surface of transfected cells by specific anti-Env antibodies.

Long abstract

HIV-1 envelope glycoproteins (Env) mediate viral entry into target cells and are essential to the infectious cycle. Understanding how those glycoproteins are able to fuel the fusion process through their conformational changes could lead to the design of better, more effective immunogens for vaccine strategies. Here we describe a cell-based ELISA assay that allows studying the recognition of trimeric HIV-1 Env by monoclonal antibodies. Following expression of HIV-1 trimeric Env at the surface of transfected cells, conformation specific anti-Env antibodies are incubated with the cells. A horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and a simple chemiluminescence reaction are then used to detect bound antibodies. This system is highly flexible and can detect Env conformational changes induced by soluble CD4 or cellular proteins. It requires minimal amount of material and no highly-specialized equipment or know-how. Thus, this technique can be established for medium to high throughput screening of antigens and antibodies, such as newly-isolated antibodies.

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry, mediated by the trimeric viral envelope glycoproteins (Env) is the first step of the infectious cycle. Being the only exposed viral antigen presented at the surface of virions, the Env trimer elicits neutralizing and non-neutralizing antibodies. As such, it represents an interesting candidate for vaccine immunogen design. However, vaccination trials with Env in soluble or recombinant forms elicited responses with only minimal effectiveness against most primary HIV-1 isolates¹⁻³. Nonetheless, partial efficacy observed in the RV144 vaccine trial⁴ renewed interest in HIV-1 Env as an immunogen candidate. This was corroborated by a recent study describing that vaccine-elicited anti-Env antibodies were sufficient to generate a certain degree of protection against SIV and HIV challenges⁵.

After being synthesized in the endoplasmic reticulum, the Env glycoprotein precursor, gp160, undergoes various post-translational modifications that are critical for its ability to fuel the viral fusion process. The Env precursor must fold properly and associate in trimers before being cleaved into its extra-cytoplasmic gp120 and transmembrane gp41 subunits⁶⁻¹⁰, with non-covalent interactions maintaining the gp120-gp41 liaison. The infected cell machinery is also responsible for heavily glycosylating Env, comprising about 50% of its total mass^{11,12}. The resulting complex structure allows Env to be conformationally flexible^{13,14}, while providing a metastability that is thought to allow Env to adapt and hide certain highly immunogenic epitopes that would otherwise be exposed¹⁵⁻¹⁹, highlighting the importance to better understand the different conformations sampled by the native Env trimer.

To date, several techniques have been developed and successfully used to study Env conformational changes. However, they vary in their limitations, being often restricted to specific Env contexts. For example, surface plasmon resonance or immunoprecipitation assays using conformation specific monoclonal antibodies

(mAbs), rely either on monomeric soluble or solubilized Env molecules which are known to be immunogenetically different from their trimeric forms^{20,21}. Recent studies also suggest that cleavage affects Env conformations resulting in the exposure of epitopes mainly recognized by non-neutralizing antibodies^{14,22,23}.

Here we describe in detail a method that allows for fast and easy determination of the conformation of cellularly-expressed Env trimers^{18,24-26}. Following transient transfection of Env in a human adherent cell line the binding of Env-specific antibodies is detected using a simple chemiluminescence reaction. This technique can also be used to characterize the conformational preference of conformation-dependent antibodies. Thus, this assay provides a robust and highly flexible detection method.

Protocol

1. Day 1 – Cell Culture

1.1 Plate 2×10^4 human osteosarcoma (HOS) cells per well in an opaque, 96-well cell-culture plate suitable for luminescence reading. Use Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin-streptomycin. Incubate until next day at 37 °C, 5% CO₂.

2. Day 2 – Polyethylenimine (PEI) Transfection

2.1 Prepare transfection mix according to subsequent steps. Adjust reagents and DNA quantities according to the number of wells that are to be transfected with the same Env.

2.1.1 Tube A: Add 10 ng Tat-encoding plasmid (such as pTat-III) and 150 ng Env-encoding plasmid to 5 µl DMEM supplemented with 25 mM HEPES.

Note: The Tat-encoding plasmid is only required when using Tat-dependent Env-encoding plasmids such as pSVIII.

2.1.2 Tube B: Add 450 ng PEI (from a 1 µg/µl solution) to 5 µl DMEM.

2.2 Add content of tube B to tube A. Mix thoroughly by vortexing for 10 sec and incubate transfection mix 10 min at room temperature (RT, 22 °C)

2.3 Add 10 µl of the transfection mix per well of the 96-well plate. Incubate for 48 hr at 37 °C, 5% CO₂.

3. Day 4 – ELISA

All experiments must be performed at room temperature to minimize possible endocytosis of Env/antibodies complexes.

3.1 Prepare 250 ml of Washing Buffer per plate being used at the same time. Washing Buffer is Tris-buffered saline (TBS) 1X pH 7.5 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl), supplemented with 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂.

3.2 Prepare 125 ml Blocking Buffer per plate by adding 1% non-fat dry milk and 5 mM Tris pH 8.0 to Washing Buffer.

3.3 Remove cell culture media and transfection mix (supernatant) from 96-well plate.

3.4 Add 100 μ l of Blocking Buffer per well and incubate 20 min at RT.

3.5 Remove supernatant and add 50 μ l of antibody (or serum) per well, diluted to appropriate concentration in Blocking Buffer. A concentration of 1 μ g/ml is usually a good starting point. Incubate 1 h at RT.

3.6 Wash 3 times with 100 μ l Blocking Buffer and then repeat washing process 3 times with 100 μ l Washing Buffer.

3.7 Remove supernatant, add 100 μ l Blocking Buffer and incubate 5 min at RT.

3.8 Remove supernatant and add 50 μ l of secondary antibody, diluted 1/3000 in Blocking Buffer. Vary optimal antibody dilution according to manufacturer differences. Incubate 40 min at RT.

3.9 Wash 3 times with 100 μ l Blocking Buffer and then repeat washing process 3 times with 100 μ l Washing Buffer.

4. Data Acquisition

4.1 Remove supernatant from the plate and add 30 μ l 1X enhanced chemiluminescence (ECL) substrate per well.

4.2 Acquire chemiluminescence signal for 1 sec per well on a suitable plate-reader according to manufacturer instructions. Reading time may differ according to hardware differences.

Representative results

Using the general procedure described above, we adapted the protocol to assay the impact of soluble CD4 (sCD4) and co-expressed cellular CD4 on the exposure of CD4i epitopes on either wild-type (wt) or mutated Env, as described previously^{18,24,25,27}. Figure 1 schematically represents the general procedure and the exposure of CD4i epitopes following treatment with sCD4 or by co-expression of cellular CD4¹⁸. In Figure 2, we used sCD4 to induce Env conformational changes that expose CD4i mAbs 17b and 48d epitopes which overlap the coreceptor binding site^{24,28}, whereas the outer-domain recognizing mAb 2G12 is not affected by this treatment, as expected^{18,24}.

The impact of point mutations in Env conformation can also be assessed using this assay, as presented in Figure 3. Here we used either the layer 1 Env mutant H66A, known to have a decreased propensity to spontaneously sample the CD4-bound conformation^{18,24,29,30} or a mutant (S375W) which predisposes Env to the CD4-bound state³¹ and obtained concordant results (Figure 3A). In cases where different Env expressors are used, it is often necessary to normalize the raw data expressed as relative light units (RLU) according to expression levels. In this case, we used PGT121, a mAb recognizing part of the Env glycan shield³²⁻³⁴, as the normalizing antibody (Figure 3B).

As we recently described¹⁸, interaction of Env and CD4 in the same cell leads to Env conformational changes that expose CD4i epitopes. In Figure 4, we co-transfected increasing amounts of a CD4 expressor together with Env in the cell-based ELISA assay and obtained increasing signals for CD4i mAbs A32 and C11^{18,35-37}, which recognize discontinuous epitopes in the inner domain of gp120, whereas Env recognition by the conformational-independent 2G12 antibody was not affected (Figure 4A). In order to control for transfection efficiency between conditions, raw data was normalized to 2G12 (Figure 4B). Increased signals obtained for A32 and C11

antibodies depended on Env-CD4 interaction as indicated by the absence of A32 and C11 modulation when Env was co-transfected with a CD4 mutant (F43H) with decreased ability to interact with Env³⁸.

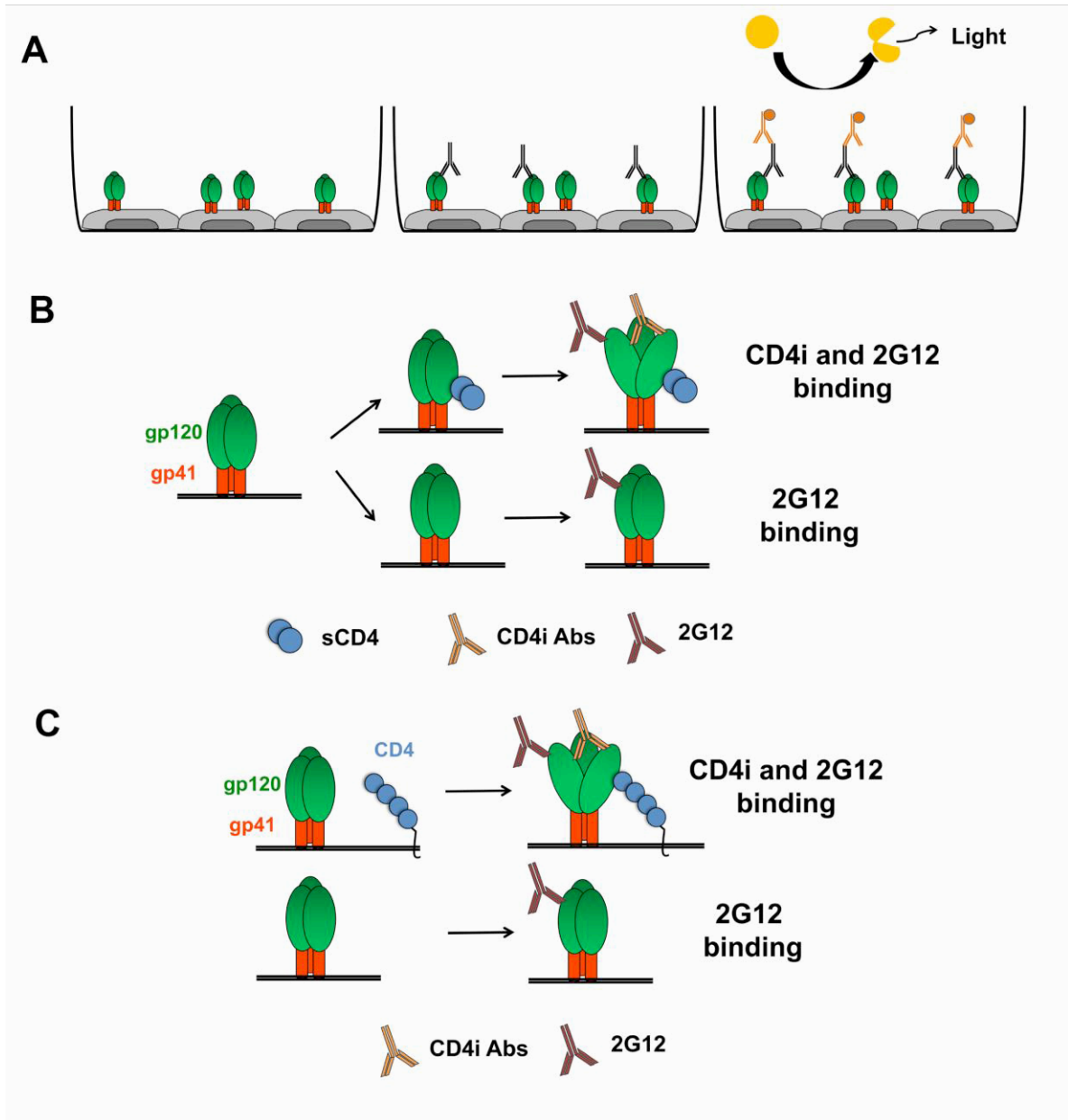


Figure 1: Schematic representation of the anti-Env cell-based ELISA.

(A) General scheme of the procedure in which HOS cells are transfected to express trimeric Env at the cell surface. Env conformation can then be sampled by using different antibodies recognizing specific conformations (such as CD4i mAbs). Signals are detected by chemiluminescence after staining with HRP-conjugated anti-human mAbs. sCD4 (B) or co-expression of cellular CD4 (C) can be used to induce Env conformational changes that lead to exposure of CD4i epitopes.

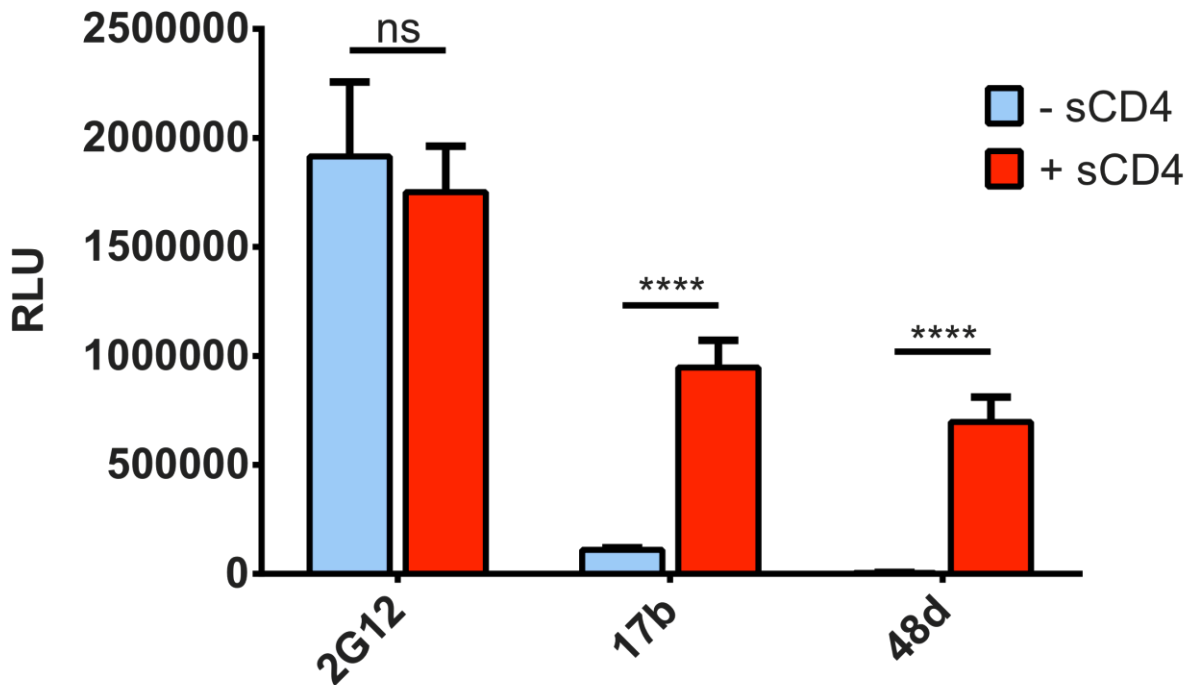


Figure 2: sCD4 induces Env conformational changes leading to exposure of CD4i epitopes.

Interaction of sCD4 with HIV-1_{CO-JRFLΔCT} Env enhances recognition by antibodies targeting CD4i epitopes (17b, 48d), but not by the gp120 outer-domain recognizing antibody 2G12. A plasmid encoding HIV-1_{CO-JRFLΔCT} Env was transfected in each well and 48h later the cells were washed and incubated in presence or absence of 4 μg/ml sCD4 for 30 min at RT before continuing with the standard protocol (Day 4 – ELISA). Env conformation was then probed by incubating with 0.25 μg/ml 2G12, 1 μg/ml 17b or 48d anti-Env mAbs for 1h at RT. Signals were detected by chemiluminescence

after incubation with an HRP-conjugated anti-human antibody for 45 min at RT. Shown are the mean RLU values \pm SD of six replicates with signal obtained from wells transfected with an irrelevant plasmid (no Env) subtracted. Data is representative of results obtained in three independent experiments, with significance tested by two-way ANOVA.

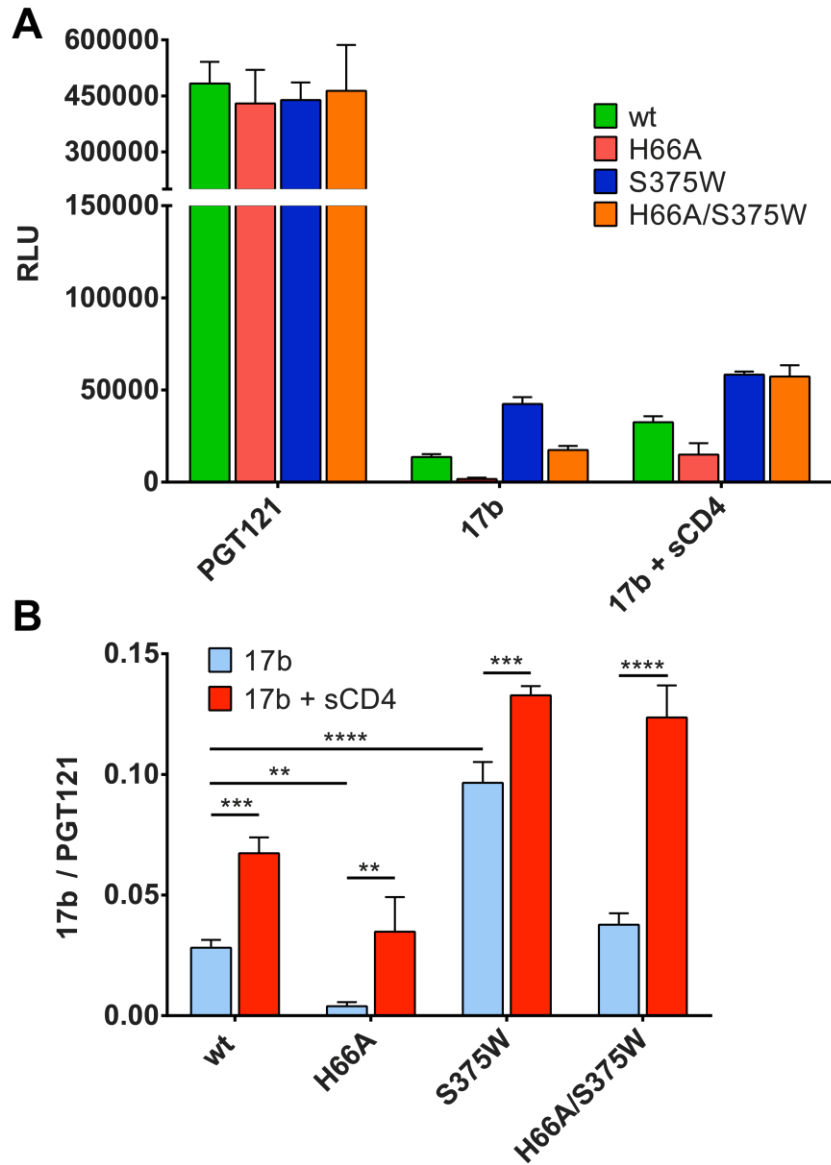


Figure 3: Modulation of Env conformation.

HIV-1 $\gamma_{U2\Delta CT}$ layer 1 Env mutant (H66A) diminishes CD4i 17b recognition whereas the S375W variant exhibits increased 17b signal and is sufficient to restore the phenotype of the layer 1 mutant. **(A)** RLU values of the signals obtained using anti-Env PGT121 and 17b mAbs. **(B)** PGT121-normalized signals of CD4i mAb 17b following treatment with or without sCD4. Shown are the mean values \pm SD of triplicates with signal obtained from wells transfected with an irrelevant plasmid (no Env) subtracted. Data is representative of results obtained in three independent experiments, with significance tested by two-way ANOVA.

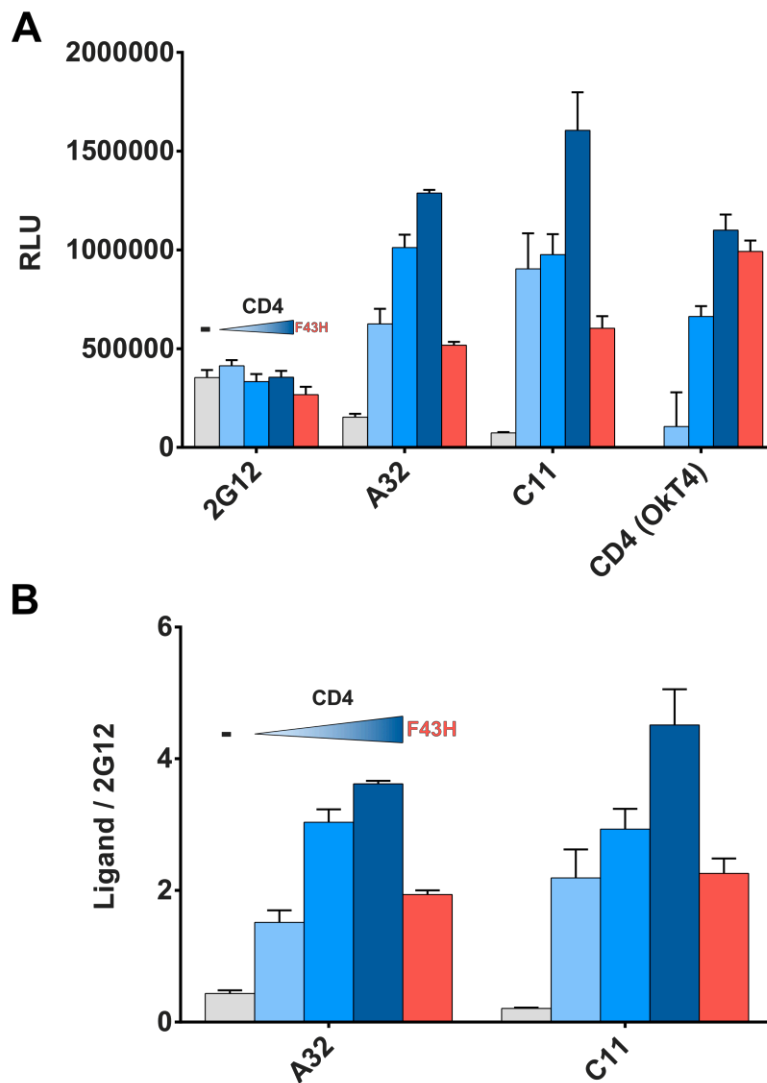


Figure 4: Co-expression of cellular CD4 enhances recognition by CD4i antibodies.

A CD4-encoding plasmid was co-transfected with HIV-1_{YU2ΔCT} Env in order to favor the CD4-bound conformation¹⁸. **(A)** RLU values of the signals obtained using anti-Env 2G12, A32 or C11 mAbs and the anti-CD4 OkT4 mAb. **(B)** 2G12-normalized signals of CD4i mAbs A32 and C11. Shown are the mean values \pm SD of triplicates with signal obtained from wells transfected with an irrelevant plasmid (no Env) subtracted. Data is representative of results obtained in three independent experiments. Grey bar indicates in absence of CD4, whereas the increasing blue bar indicates a step-wise increase in the amount of CD4 expressor being transfected (1.7, 3.5 and 7 ng) and red bar indicates the transfection of a CD4 mutant (F43H, 7 ng) with decreased capacity to interact with gp120.

Discussion

This assay is optimized to detect the interaction of specific mAbs with HIV-1 trimeric Env expressed at the cell surface. Once the protocol has been established, it can be used at medium to high throughputs with low overall material costs and little amounts of antibodies. Since this assay is transfection-based, it can easily be adapted for co-expression of cellular proteins such as CD4 in order to study their effects on Env conformation.

However, the transfection base of this protocol also implies that it is one of its most important pitfalls. First off, antigens to be studied with this technique are required to be available in an independent expression vector. As such, Env genes from various clinical sources or proviral constructs would need to be sub-cloned into mammalian expression vectors. While full-length proviral constructs can also be used in this technique (see reference 18), this also implies active viral particles production thus requiring work in appropriate bio-containment facilities.

Moreover, success of this technique is intimately linked with transfection efficiency. Low signals obtained are often due to poor expression of transfected antigens. Typical sources of problems are plasmid DNA quality, transfection reagents and cells viability. If required, optimization of transfection conditions could also be performed using other techniques, such as flow cytometry or western blotting. Of note, it is also important to be aware that expression of some Env constructs could be sub-optimal and could therefore affect the technique's outcome.

Here we focused on probing HIV-1 Env conformation using previously described CD4i mAbs. This setting allows for a broad range of analysis such as probing the effect of Env point mutations or the conformational consequences of co-expressed proteins. Moreover, the technique described here can also be used with well-characterized Env mutants with different conformational propensity in order to probe the specificity of

different mAbs for various Env conformations. This allows an easy and rapid characterization of newly isolated mAbs while not requiring highly-specialized equipment or know-how.

Although we only used this method against Env from various HIV-1 clades and other close relative lineages (HIV-2, SIV/Mac)¹⁸, we believe this assay could be adapted for additional surface antigens, such as ones from other virus families.

Acknowledgments

We thank Dr James Robinson for his generous gift of A32, 17b, 48d and C11 mAbs. PGT 121 was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (Cat#12343). This work was supported by a Canada Foundation for Innovation Program Leader #29866, by a CIHR operating #257792, by a FRQS Establishment of Young Scientist grant #24639 to AF and by a CRCHUM continuum grant as well as by a CIHR catalyst grant #126630 to AF and MR. AF is the recipient of a FRSQ Chercheur Boursier Junior 1 fellowship #24639. MV was supported by a CIHR Doctoral Research Award #291485.

Disclosure

The authors have no conflicts of interest to report.

References

- 1 Bures, R. *et al.* Immunization with recombinant canarypox vectors expressing membrane-anchored glycoprotein 120 followed by glycoprotein 160 boosting fails to generate antibodies that neutralize R5 primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS research and human retroviruses* **16**, 2019-2035, doi:10.1089/088922200750054756 (2000).
- 2 Koff, W. C. HIV vaccine development: challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem. *Vaccine* **30**, 4310-4315, doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.014 (2012).
- 3 Mascola, J. R. *et al.* Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *The Journal of infectious diseases* **173**, 340-348 (1996).
- 4 Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England journal of medicine* **361**, 2209-2220, doi:10.1056/NEJMoa0908492 (2009).
- 5 Roederer, M. *et al.* Immunological and virological mechanisms of vaccine-mediated protection against SIV and HIV. *Nature* **505**, 502-508, doi:10.1038/nature12893 (2014).
- 6 Fennie, C. & Lasky, L. A. Model for intracellular folding of the human immunodeficiency virus type 1 gp120. *Journal of virology* **63**, 639-646 (1989).
- 7 Willey, R. L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A. & Klausner, R. D. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9580-9584 (1988).
- 8 Bosch, V. & Pawlita, M. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *Journal of virology* **64**, 2337-2344 (1990).
- 9 Hallenberger, S. *et al.* Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361, doi:10.1038/360358a0 (1992).
- 10 Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**, 417-428, doi:10.1006/viro.2000.0357 (2000).

- 11 Leonard, C. K. *et al.* Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry* **265**, 10373-10382 (1990).
- 12 Wang, W. *et al.* A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. *Retrovirology* **10**, 14, doi:10.1186/1742-4690-10-14 (2013).
- 13 Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C. & Sodroski, J. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *Journal of virology* **65**, 2119-2123 (1991).
- 14 Haim, H., Salas, I. & Sodroski, J. Proteolytic processing of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein precursor decreases conformational flexibility. *Journal of virology* **87**, 1884-1889, doi:10.1128/JVI.02765-12 (2013).
- 15 Chen, L. *et al.* Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* **326**, 1123-1127, doi:10.1126/science.1175868 (2009).
- 16 Kwong, P. D. *et al.* HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-682, doi:10.1038/nature01188 (2002).
- 17 Sakai, K. & Takiguchi, M. Toward an effective AIDS vaccine development. *European journal of immunology* **43**, 3087-3089, doi:10.1002/eji.201370125 (2013).
- 18 Veillette, M. *et al.* Interaction with Cellular CD4 Exposes HIV-1 Envelope Epitopes Targeted by Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Journal of virology* **88**, 2633-2644, doi:10.1128/JVI.03230-13 (2014).
- 19 Wibmer, C. K. *et al.* Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. *PLoS pathogens* **9**, e1003738, doi:10.1371/journal.ppat.1003738 (2013).
- 20 Kovacs, J. M. *et al.* HIV-1 envelope trimer elicits more potent neutralizing antibody responses than monomeric gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 12111-12116, doi:10.1073/pnas.1204533109 (2012).
- 21 Yuan, W., Bazick, J. & Sodroski, J. Characterization of the multiple conformational States of free monomeric and trimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins after fixation by cross-linker. *J Virol* **80**, 6725-6737, doi:10.1128/JVI.00118-06 (2006).
- 22 Guttman, M. & Lee, K. K. A functional interaction between gp41 and gp120 is observed for monomeric but not oligomeric, uncleaved HIV-1 Env gp140. *Journal of virology* **87**, 11462-11475, doi:10.1128/JVI.01681-13 (2013).

- 23 Ringe, R. P. *et al.* Cleavage strongly influences whether soluble HIV-1 envelope glycoprotein trimers adopt a native-like conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18256-18261, doi:10.1073/pnas.1314351110 (2013).
- 24 Desormeaux, A. *et al.* The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *Journal of virology* **87**, 2549-2562, doi:10.1128/JVI.03104-12 (2013).
- 25 Haim, H. *et al.* Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. *PLoS pathogens* **5**, e1000360, doi:10.1371/journal.ppat.1000360 (2009).
- 26 Haim, H. *et al.* Contribution of intrinsic reactivity of the HIV-1 envelope glycoproteins to CD4-independent infection and global inhibitor sensitivity. *PLoS pathogens* **7**, e1002101, doi:10.1371/journal.ppat.1002101 (2011).
- 27 Medjahed, H., Pacheco, B., Desormeaux, A., Sodroski, J. & Finzi, A. The HIV-1 gp120 major variable regions modulate cold inactivation. *J Virol* **87**, 4103-4111, doi:10.1128/JVI.03124-12 (2013).
- 28 Thali, M. *et al.* Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *Journal of virology* **67**, 3978-3988 (1993).
- 29 Finzi, A. *et al.* Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol Cell* **37**, 656-667, doi:10.1016/j.molcel.2010.02.012 (2010).
- 30 Kassa, A. *et al.* Transitions to and from the CD4-bound conformation are modulated by a single-residue change in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 inner domain. *J Virol* **83**, 8364-8378, doi:10.1128/JVI.00594-09 (2009).
- 31 Xiang, S. H. *et al.* Mutagenic stabilization and/or disruption of a CD4-bound state reveals distinct conformations of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *Journal of virology* **76**, 9888-9899 (2002).
- 32 Mouquet, H. *et al.* Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3268-3277, doi:10.1073/pnas.1217207109 (2012).
- 33 Julien, J. P. *et al.* Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS pathogens* **9**, e1003342, doi:10.1371/journal.ppat.1003342 (2013).
- 34 Walker, L. M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466-470, doi:10.1038/nature10373 (2011).

- 35 Moore, J. P., Willey, R. L., Lewis, G. K., Robinson, J. & Sodroski, J. Immunological evidence for interactions between the first, second, and fifth conserved domains of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* **68**, 6836-6847 (1994).
- 36 Robinson JE, Y. H., Holton D, Elliott S, Ho DD. Distinct antigenic sites on HIV gp120 identified by a panel of human monoclonal antibodies. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* **16E**, Q449 (1992).
- 37 Bonsignori, M. *et al.* Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating Antibodies from an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial Target Multiple Epitopes and Preferentially Use the VH1 Gene Family. *Journal of virology* **86**, 11521-11532, doi:10.1128/JVI.01023-12 (2012).
- 38 Brand, D., Srinivasan, K. & Sodroski, J. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *Journal of virology* **69**, 166-171 (1995).

Annexe 2 :

Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses

Cet article a été publié dans le journal : Journal of Virological Methods

Contribution des co-auteurs :

Andrés Finzi et Michel Roger ont contribué à l'élaboration des plans de l'étude. Jonathan Richard et Maxime Veillette ont participé au développement et l'optimisation de la technique. Jonathan Richard a réalisé les expériences pour les figures 1, 4, 5, 6, S1 et S2 et a réalisé la figure 2. Laurie-Anne Batrville a réalisé les expériences pour la figure 3. Mathieu Coutu participé à la génération de plusieurs réactifs, tandis que Jean-Philippe Chapleau a réalisé des expériences pour la figure supplémentaire 2 (S2). Mattia Bonsignori a fourni l'anticorps CH54. Cécile Tremblay et Nicole Bernard ont fourni les échantillons de patients séropositifs. Daniel E Kaufmann a fourni les échantillons de PBMC de donneurs sains pour les expériences et a révisé le manuscrit. Andrés Finzi est le chercheur principal du projet. L'article a été rédigé par Jonathan Richard et Andrés Finzi.

Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses

Jonathan Richard^{1,2}, Maxime Veillette ^{1,2}, Laurie-Anne Batrville ^{1,2}, Mathieu Coutu^{1,2}, Jean-Philippe Chapleau^{1,2}, Mattia Bonsignori³, Nicole Bernard⁴, Cécile Tremblay^{1,2,5}, Michel Roger^{1,2}, Daniel E. Kaufmann^{1,2,6} and Andrés Finzi^{1,2,7}.

¹Centre de Recherche du CHUM, ²Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, ³Duke Human Vaccine Institute, Duke University Medical Center, ⁴ Research Institute of the McGill University Health Centre, Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, ⁵Institut National de santé publique du Québec, ⁶Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology, and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA, ⁷Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

#Corresponding author:

Andrés Finzi

Centre de recherche du CHUM (CRCHUM)

Running Title: Novel FACS-based assay to study anti-HIV-1 ADCC responses.

Key Words: HIV-1, ADCC responses, gp120 Env, FACS-based method, ADCC-mediating antibodies.

Word Count for Abstract: 155

Word Count for Text: 2509

Abstract:

Increased attention on the role of Fc-mediated effector functions against HIV-1 has led to renewed interest into the role that antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) could play in controlling viral transmission and/or the rate of disease progression. While ⁵¹Chromium release assays have traditionally been used to study ADCC responses against HIV-1, a number of alternative flow-cytometry-based assays were recently developed. In this study, an alternative flow-cytometry-based assay was established to allow non-radioactive measurement of ADCC-mediated elimination of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein (Env)-coated target cells. This assay relies on staining target and effector cells with different dyes, which allows precise gating and permits the calculation of the number of surviving target cells by normalization to flow-cytometry particles. By using small concentrations of recombinant gp120 Env, suitable targets cells that recapitulate the ADCC response mediated against HIV-1-infected cells were generated. Finally, this method was applied successfully to screen human sera for ADCC activity directed against HIV-1 gp120 Env.

Text

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) response is an antibody-driven immune mechanism that recruits effector cells such as Natural Killer (NK) cells, monocytes and neutrophils and activates them against infected cells expressing surface antigens, resulting in their elimination. Besides antibody-mediated viral neutralization, ADCC was one of the earliest antibody functions observed in HIV-1-infected individuals (Lyerly et al., 1987). The HIV-1 envelope glycoprotein (Env) is the main target antigen at the surface of infected cells for antibodies that mediate these functions (Lyerly et al., 1987; Koup et al., 1989). The importance of ADCC in controlling HIV-1 and SIV was subsequently reported in several studies (reviewed in (Lewis, 2013)). The immune-correlates analysis of the RV144 vaccine trial indicated that ADCC activity in association with low levels of serum IgA was linked with decreased HIV-1 acquisition (Bonsignori et al., 2012; Haynes et al., 2012). Accordingly, potent ADCC-mediating monoclonal antibodies (mAbs) were isolated from a subset of RV144 vaccinees (Bonsignori et al., 2012). It has been recently suggested that ADCC responses apply significant immune pressure on individuals infected with HIV-1 during the course of natural infection, further supporting the potential impact of ADCC on HIV-1 progression (Chung et al., 2011).

While ADCC responses to HIV-1 were first assayed using the ⁵¹Chromium release assay (Tyler et al., 1990; Ahmad et al., 1994; Baum et al., 1996), a number of alternative flow-cytometry-based assays were subsequently developed. The majority of these assays use T cells coated with HIV-1 Env (gp120 or gp140) as target cells, although HIV-1-infected cell lines have also been used (reviewed in (Kramski et al., 2013)). These assays commonly evaluate NK cell activation (IFN- γ , granzyme B and CD107a)(Stratov, Chung, and Kent, 2008; Chung et al., 2009; Madhavi et al., 2013), the delivery of granzyme B to target cells

(Pollara et al., 2011; Smalls-Mantey et al., 2012) or the percentage of apoptotic target cells (Kantakamalakul et al., 2006). However, these techniques do not directly measure the elimination of target cells. To date, ADCC-mediated loss of HIV-1 infected cells has been measured using LTR-Luciferase engineered target cells (Alpert et al., 2012), GFP-expressing viruses (Pham et al., 2014; Veillette et al., 2014) and intracellular anti-p24 staining (Smalls-Mantey et al., 2012). The rapid and fluorometric ADCC (RFADCC) which relies on the release of intracellular fluorescent dye (Gomez-Roman et al., 2006), is a flow cytometry-based assay that allows assessment of gp120-coated target cells killing. However, a recent report suggested that this assay primarily reflects Ab-mediated monocyte phagocytosis (Kramski et al., 2012). Here, an alternative flow-cytometry-based assay was developed to permit accurate calculation of ADCC-mediated elimination of gp120-coated targets without the use of radioactivity.

The interaction of HIV-1 Env with the CD4 receptor was recently reported to be required for efficient exposure of ADCC-mediating Env epitopes at the surface of HIV-1 infected cells (Veillette et al., 2014). Accordingly, the ability of Env to reach the CD4-bound conformation was found to be critical for exposure of Env ADCC-mediating epitopes (Veillette et al., 2014). Thus, cell-surface CD4 down-regulation by Nef and Vpu accessory proteins, as well as Vpu-mediated Tetherin/BST-2 antagonism reduced Env ADCC-mediating epitope exposure, negatively impacting the susceptibility of infected cells to this effector function (Veillette et al., 2014). Based on these data, cells infected with virus lacking both Vpu and Nef (i.e. presenting high levels of CD4 and Env at the cell surface) were shown to be suitable target cells to evaluate anti-HIV-1 Env ADCC responses. Since working with HIV-1-infected cells requires complex manipulations and a biosafety level containment laboratory to ensure safety, a simpler assay that could be carried out under standard level 2 biocontainment was

developed in this study. Since HIV-1 gp120 Env represents one of the main targets for ADCC-mediating Abs (Lyerly et al., 1987), cells coated with recombinant HIV-1_{YU2} gp120 proteins were used as target cells. In order to specifically study ADCC responses, CEM.NKr cells, a CD4⁺ T cell line resistant to direct NK cell killing mediated by natural cytotoxicity receptors, were used as target cells (Howell et al., 1985; Alpert et al., 2012).

Recombinant HIV-1_{YU2} gp120 proteins were produced and purified as previously described (Finzi et al., 2010; Desormeaux et al., 2013). First, the minimal amount of recombinant HIV-1 gp120 required to coat target cells was determined by flow cytometry, by evaluating the capacity of different specific anti-gp-120 mAbs to recognize gp120-coated cells and cells infected with HIV-1 lacking both Vpu and Nef. Briefly, CEM.NKr cells were coated with increasing concentrations of recombinant HIV-1_{YU2} gp120 (10, 50, 100 or 250 ng/ml) for 30 min at 37°C (7.5×10^5 cells/ml) or were infected with VSV-G-pseudotyped HIV-1 NL4.3.ADA.GFP.IRES.Nef- Vpu- virus, as previously described (Veillette et al., 2014). To evaluate the level of HIV-1 gp120 Env present at cell-surface, cells were stained with the conformation-independent gp120 outer domain-recognizing 2G12 antibody and then fluorescently labeled with an Alexa-fluor 647-coupled goat anti-human IgG secondary antibody (Invitrogen, San Diego, CA, USA). As expected, recognition of gp120-coated target cells by 2G12 was dependent on the concentration of recombinant HIV-1 gp120 used to coat the cells (Fig.1A-B). Interestingly, coating target cells with 50 ng/ml of recombinant HIV-1 gp120 was sufficient to reach 2G12 binding levels similar to those observed in HIV-1-infected cells (Fig.1A-B), thus indicating that, in this method, a concentration of 50 ng/ml gp120 Env per 7.5×10^5 CEM-NKr/ml is sufficient to reach levels of Env similar to those observed at the surface of infected cells. Higher gp120 concentrations (100 ng/ml and 250 ng/ml) exceeded Env levels present at the surface of HIV-1-infected cells. To specifically evaluate the

exposure of ADCC-mediating gp120 epitopes, cells were also stained with different CD4-induced ADCC-mediating Abs, including the A32 mAb (Moore et al., 1994; Veillette et al., 2014), the A32-blockable CH54 mAb isolated from an RV144 trial vaccine recipient (Bonsignori et al., 2012) and the anti-cluster A L9-i1 mAb (Guan et al., 2013). Similarly, coating CEM.NKr cells with 50 ng/ml of recombinant gp120 was sufficient to reach the level of gp120 Env ADCC-mediating epitope recognized by these antibodies at the surface of HIV-1-infected cells (Fig.3C).

A recently-described assay that allowed to calculate elimination of HIV-1-infected cells (Veillette et al., 2014) was next adapted to obtain a simple and rapid FACS-based assay measuring elimination of gp120-coated target cells by ADCC. The new assay was performed as outlined in Figure 2. Briefly, target cells were labelled with the viability dye AquaVivid (Invitrogen, San Diego, CA, USA) and the cellular marker eFluor670 (eBiosciences, San Diego, CA, USA), whereas effector cells were labelled with the cellular marker eFluor450 (eBiosciences, San Diego, CA, USA). Cell labeling was performed according to manufacturer's directions. Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from healthy donors were used as the source of effector cells. After washing with culture medium (RPMI, 10% FBS), 1×10^5 target cells were mixed with 1×10^6 effector cells in 96-wells V-bottom plates (Corning, Corning, NY, USA) in the presence or absence of a 1:1000 dilution of human serum or 5 μ g/ml of ADCC-mediating mAbs for 4h to 6h at 37°C, in a humidified 5% CO₂ incubator. Cells were then fixed with a PBS-formaldehyde solution (2% formaldehyde final concentration) containing a constant number of flow cytometry particles (5×10^4 /ml) (AccuCount Blank Particles, 5.3 μ m; Spherotech, Lake Forest, IL, USA). These particles are designed to be used as reference particles since their concentration is known. Thus allowing to count the absolute cell number by flow cytometry. A

constant number of particles ($\sim 1 \times 10^3$) were counted during cytometry acquisition in order to normalize the number of viable target cells. Each sample was acquired with a LSRII (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada) and data analysis was performed using FlowJo vX.0.6 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

To calculate the number of normalized single viable target cells that survived the incubation period in presence of mAbs and effector cells, the gating strategy shown in Figure 3A was developed. The first gate was set to include the target cells according to cell morphology by light-scatter parameters using target cells alone (first row). After gating on single cells (data not shown), target cells were identified based on the eFluor670 marker; thus excluding effector cells labeled with the eFluor450 cellular marker (second row). Finally, viable target cells were identified by exclusion of non-viable target cell population labeled with Aquavidin (Third row). In parallel, flow cytometry particles were identified according to their morphology (first row) and served to normalize the number of viable target cells (Fig.3A). The normalized number of viable target cells was used to calculate the percentage (%) of cytolysis by using the formula presented in Figure 3C. As shown in Figure 3A, in the presence of effector and target cells alone (second column), a small decrease in the number of normalized viable target cells was observed compared to target cells alone (first column), which most likely represents ADCC-independent target cell killing, as previously reported with CEM.NKr cells (Richard et al., 2010). However, upon addition of the ADCC-mediating A32 mAb (third column), a significant decrease in the number of live target cells (6126 vs 10652, representing 35,9% of ADCC-mediated killing) was observed. Of note, this ADCC-mediated killing was specific to A32 since it was completely blocked by pre-incubating target cells with the A32 Fab fragment (5 μ g/ml, 30 min) (fourth column). Although an optimal ADCC response was obtained using 5 μ g/ml of A32 mAb, it is worth mentioning that ADCC-mediating killing was also detected using lower concentrations of ADCC-

mediating Abs using this assay (Fig.S1 A).

During viral infection, ADCC contributes to viral clearance through specific recognition and, most importantly, targeted elimination of virus-infected cells. In contrast to previous ADCC assays using gp120-coated target cells, this method directly measures ADCC-mediated elimination of target cells rather than NK cell activation (Stratov et al., 2008; Chung et al., 2009; Madhavi et al., 2013), delivery of granzyme B into target cells (Pollara et al., 2011; Smalls-Mantey et al., 2012) or assessment of the percentage of apoptotic target cells (Kantakamalakul et al., 2006). Staining target and effector cells allows for precise calculation of target cells number; excluding effector cells that could have internalized eFluor670 membrane fragments or engulfed intact target cells (eFluor670+eFluor450+ effector cells) (Fig.3A), as previously reported for the RFADCC assay (Kramski et al., 2012). Notably, in contrast to flow-cytometry based method evaluating ADCC-mediated elimination of HIV-1 infected cells (Alpert et al., 2012; Smalls-Mantey et al., 2012; Pham et al., 2014; Veillette et al., 2014), this assay does not require pre-infection of target cells and a biosafety level containment laboratory to ensure safety. In that context, the proposed experiments outlined in Figure 2 allow a rapid evaluation of ADCC responses, which takes 6-8 h from target cell preparation to flow cytometry acquisition.

To determine whether the results obtained with gp120-coated target cells could reproduce the ADCC response mediated against CEM.NK_r cells infected with HIV-1 lacking Nef and Vpu, the assay was performed as described above using gp120-coated or HIV-1 infected cells as target cells. With the exception that viable HIV-1-infected target cells were determined as eFluor670+eFluor450-Aquavidin-GFP⁺ cells, the gating strategy remained the same as shown in Figure 3. Figure 4A-B shows that no significant differences in the percentage of ADCC-mediated killing were observed between gp120-coated or HIV-1-

infected target cells. This is likely due to the fact that gp120 Env coats CEM-NKr cells through CD4 interaction, thus forcing gp120 Env to sample the CD4-bound conformation, which results in the exposure of CD4-induced ADCC-mediating epitopes such as those recognized by A32, CH54 and L9-i1 (Fig. 1C) and mimicking conformations achieved by infecting cells with HIV-1 viruses lacking Nef and Vpu accessory proteins (Veillette et al., 2014). Indeed, introduction of a mutation in the HIV-1 gp120 CD4-binding site (D368R), known to impair gp120-CD4 interaction, completely abrogated binding of gp120 to target cells (Fig.S2A) and consequently their ADCC-mediated elimination (Fig.S2B). As expected, the A32-induced ADCC-mediated killing of either HIV-1-infected or gp120-coated cells was significantly reduced when A32 Fab fragments were added prior to incubation with the full A32 antibody (Fig.4A-B).

The capacity of PBMCs and purified NK cells to mediate an ADCC-response using this method was next compared. The assay was performed as described above using 1×10^5 CEM.NKr cells coated with gp120 as target cells and 1×10^6 PBMCs or 1×10^5 purified NK cells obtained from the same donor, as effector cells. NK cell were isolated from cryopreserved PBMCs by negative selection using magnetic beads (EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit, StemCell, Vancouver, BC, Canada) after an overnight rest. As shown in Figure 5, only a small reduction in the A32-induced ADCC-mediated killing was observed when purified NK cells were used as effector cells relative to PBMCs. Thus, these results suggest that NK cells play a major role in the ADCC response mediated against gp120-coated target cells in this assay but also indicates that other cells present in PBMCs such as monocytes could contribute to a smaller extent to target cell killing, in agreement with previous studies (Pollara et al., 2011; Smalls-Mantey, Connors, and Sattentau, 2013).

This assay was next applied to determine the capacity of sera collected from 18 individuals infected with HIV-1 and 5 healthy subjects (non-infected individuals) to mediate a specific HIV-1 gp120 ADCC response. Individuals infected with HIV-1 were recruited from the Canadian Cohort of HIV Infected Slow Progressors (Peretz et al., 2007; Pereyra et al., 2010; Kanya et al., 2011). Informed consent was obtained from all study participants and research adhered to the ethical guidelines of CRCHUM. The percentage of ADCC-mediated killing induced by human sera (using a 1:1000 dilution) was normalized to the ADCC-mediated killing obtained when using the A32 mAb. As shown in Fig.6A, sera from individuals infected with HIV-1 were found to induce moderate to potent HIV-1 specific gp120 ADCC, whereas background level lysis was detected using sera from, healthy subjects, demonstrating the specificity of the method. It is important to mention that ADCC responses were also detected using higher dilutions of HIV+ sera (Figure S1B), but none when target cells were not coated with gp120 (Figure S1C), highlighting the sensitivity of the assay . To test the reproducibility of the assay, HIV-1 gp120 specific ADCC responses mediated by the A32 mAb and sera obtained from individuals infected or not with HIV-1, were measured in four consecutive assays using PBMCs, as effector cells, from the same donor (Fig.6B). Very little variation between experiments was observed, with a coefficient of variation of 8% to 12% for A32 and sera from individuals infected with HIV-1, demonstrating the reproducibility of the assay. ADCC responses mediated by HIV+ sera against gp120-coated cells were next compared to those mediated against cells infected with HIV-1 lacking Nef and Vpu (Fig.6C). As obtained with ADCC-mediating mAbs (Fig.4A), no significant differences in the percentage of ADCC-mediated killing were observed between gp120-coated or HIV-1-infected target cells when using HIV+ sera (Fig.6C). Thus, suggesting that most of the ADCC-mediating Abs present in

HIV+ sera are directed against HIV-1 gp120 Env. Altogether, these results demonstrate the reliability and potential of this method to screen for ADCC activity directed against the HIV-1 gp120 glycoprotein.

In conclusion, this method represents a simple, rapid and reliable FACS-based assay to study HIV-1 gp120 specific ADCC responses that recapitulate those obtained using HIV-1-infected cells.

Acknowledgments

The authors thank Nathalie Brassard and Stéphanie Matte for technical assistance as well as Mario Legault for cohort coordination. We thank Dr Jean-Pierre Routy and Ms Josée Girouard for providing access to leukapheresis samples. We thank Dr David Evans for kindly providing CEM-NKr cells, Dr George Lewis for L9-i1, Dr James Robinson and Dr Guido Ferrari for A32 and its Fab fragment. This work was supported by a Canada Foundation for Innovation Program Leader grant #29866, by CIHR operating grants #119334 and #134117, by a FRQS Establishment of Young Scientist grant #26702 to A.F, by a CIHR catalyst grant #126630 to A.F and M.R. and by the FRQS AIDS and Infectious Diseases Network. A.F. is the recipient of a Canada Research Chair on Retroviral Entry. J.R was supported by a CIHR Fellowship award, M.V. was supported by a CIHR Doctoral Research Award #291485 and JPC by a COPSE award. CT is a FRQS scholar and University of Montreal/Pfizer chair on HIV translational research. We are thankful for subject's participation and collaboration. The authors have no conflicts of interest to report.

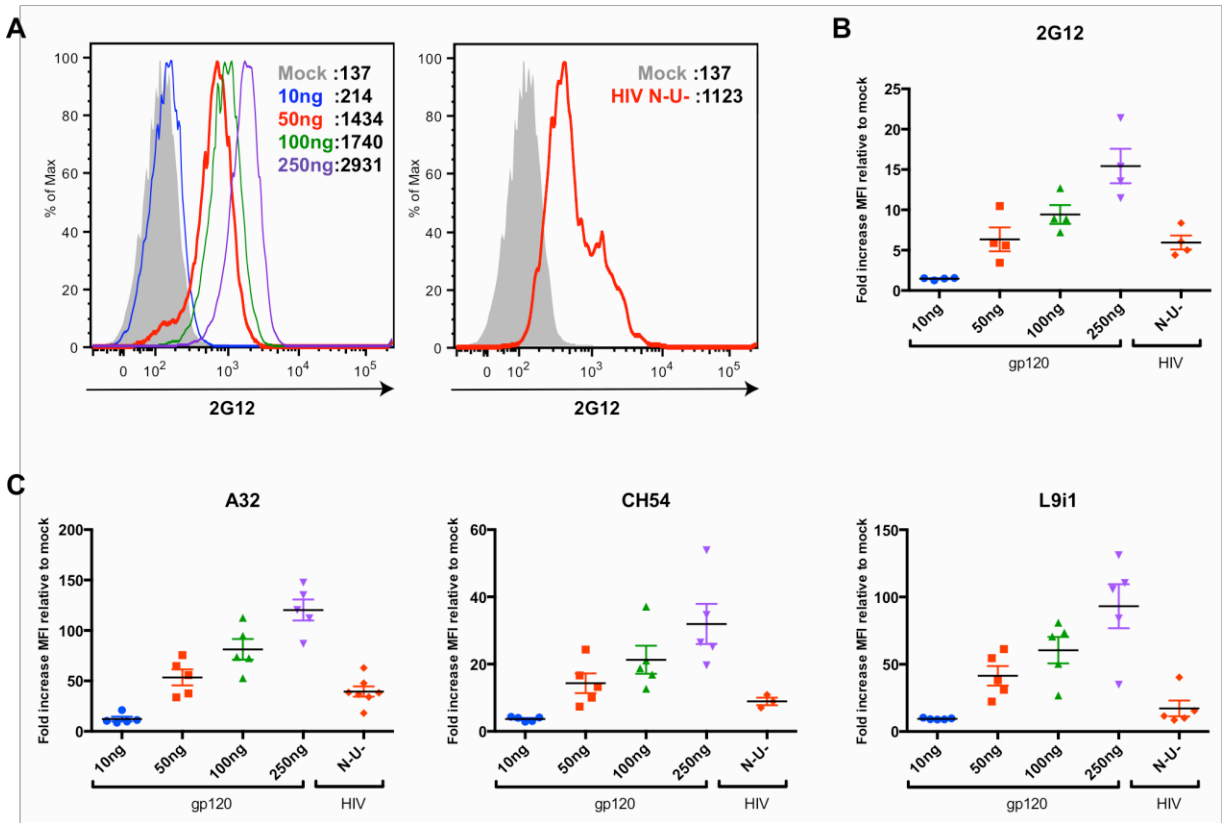


Figure 1. Recognition of recombinant HIV-1 gp120-coated and HIV-1 infected target cells by specific anti-gp120 antibodies. CEM.NKr cells were either coated with increasing concentrations of recombinant HIV-1 gp120 (10, 50, 100 or 250 ng/ml) for 30 min or were infected with VSV-G-pseudotyped HIV-1 lacking Nef and Vpu (N-U-) for 48h. The ability of the anti-gp120 2G12 (**A-B**) or the CD4-induced ADCC-mediated mAbs A32, CH54 or L9i1 (**C**) to recognize gp120-coated or HIV-1 infected cells was evaluated by flow cytometry using appropriate secondary Abs. (**A**) The numbers shown in the graph represents mean fluorescence intensity (MFI) values. (**B-C**) Signals were normalized to the MFI value of the mock control (fold-change). Data shown are the results of at least 3 independent experiments and error bars depict the standard error of the mean (SEM)

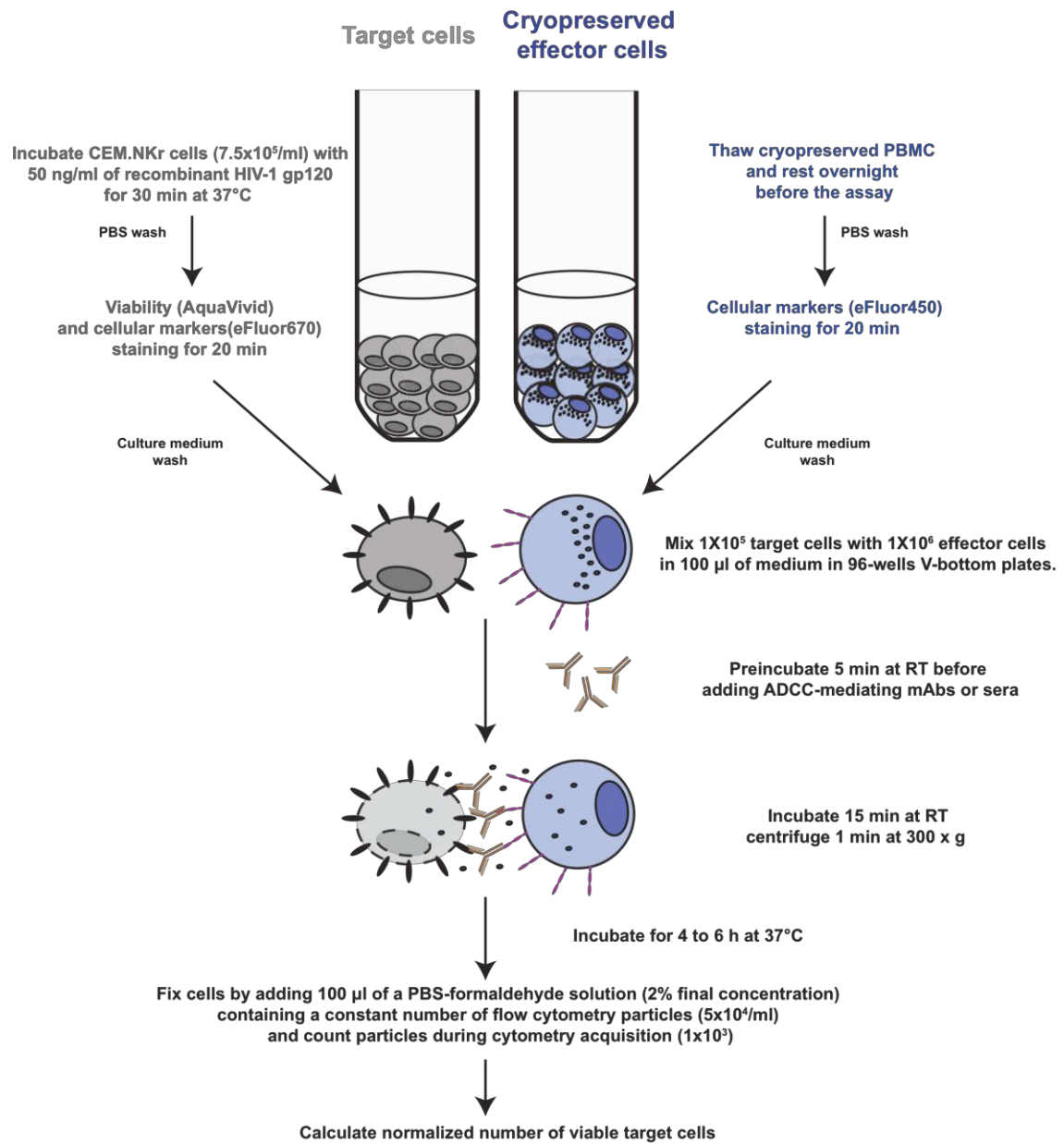
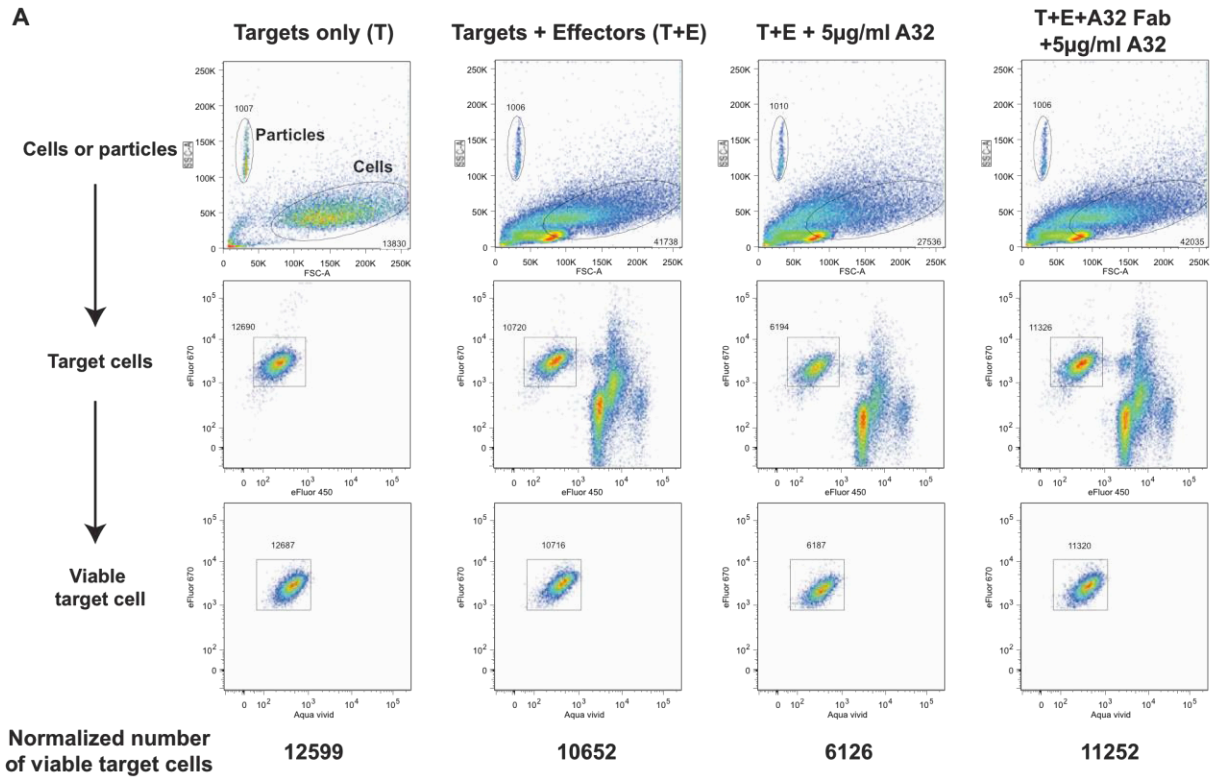


Figure 2. Assay overview. A schematic representation of the assay providing the outline of the protocol.



B

$$\% \text{ of ADCC} = \frac{(T+E) - (T+E+\text{Abs or serum})}{(T)} \times 100$$

$$\% \text{ of A32-induced ADCC} = \frac{(10652 - 6126)}{(12599)} \times 100 = 35.92\%$$

Figure 3. Gating strategy and calculation to evaluate the percentage of ADCC-mediated killing. (A) Target cells were identified according to cell morphology by light-scatter parameters (first row), based on their pre-labeling with eFluor670 and excluding the effector cells labeled with eFluor450 (second row). The viable target cells are then identified by exclusion of the non-viable target cell population labeled with Aquavidin (Third row). Flow cytometry particles are identified according to their morphology (first row). The normalized

number of viable target cells was calculated relative to 1×10^3 flow cytometry particles (B) Formula used to calculate the percentage of ADCC using the normalized number of viable target cells. Data shown is representative of at least 4 experiments.

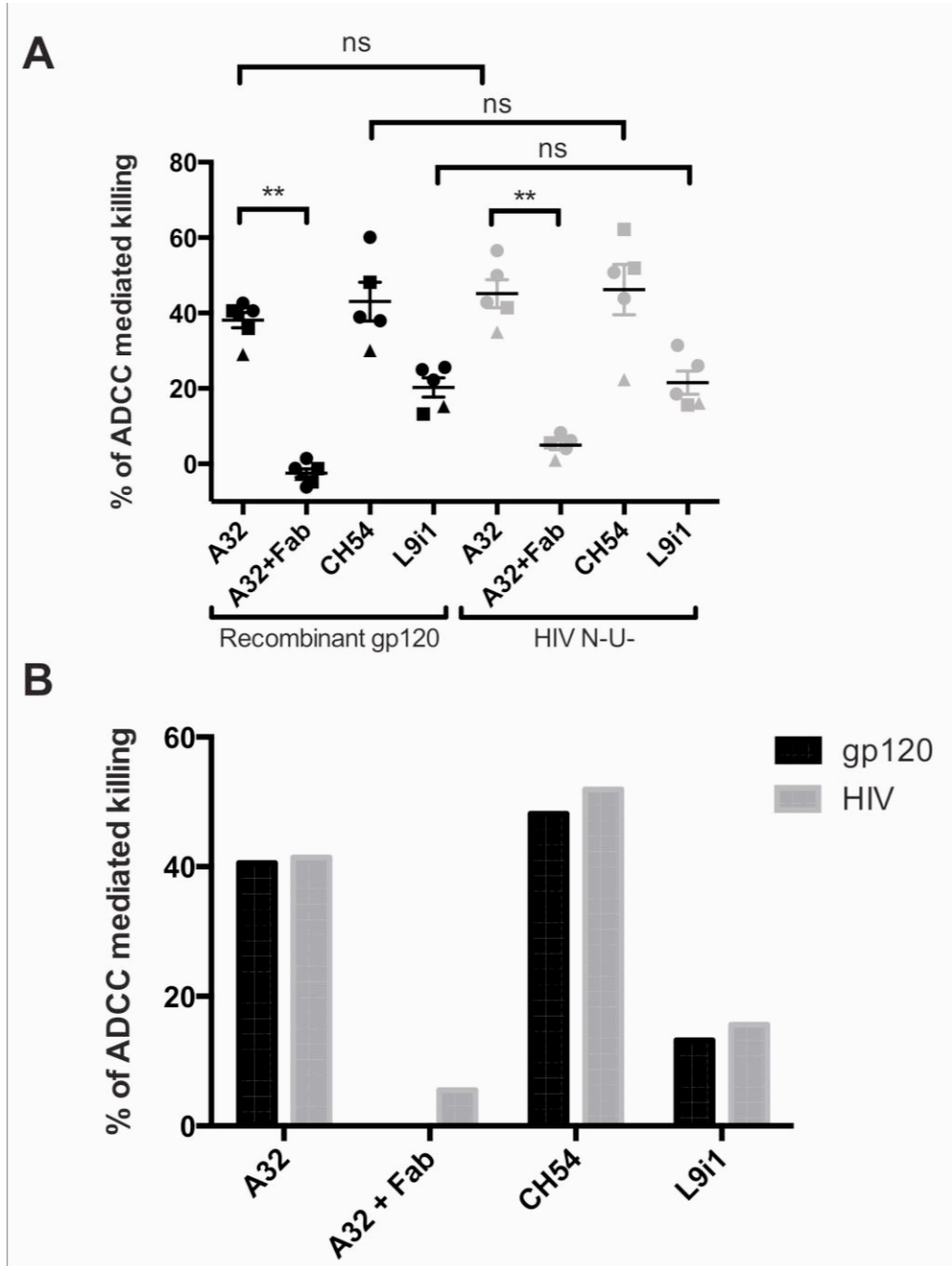


Figure 4. Comparison of the ADCC response mediated against gp120-coated cells and

HIV-1 infected cells. CEM.NKr cells were either coated with 50 ng/ml of recombinant HIV-1 gp120 for 30 min or were infected with HIV-1 lacking Nef and Vpu (N-U-) for 48h. The ADCC assay was performed as described in Fig.2 using the ADCC-mediating mAbs A32, CH54 and L9-i1 at 5 µg/ml. Alternatively, target cells were pre-incubated 30 min with 5 µg/ml of A32-Fab prior incubation with effector cells and the A32 mAbs. Viable gp120-coated target cells were identified as presented in Fig.3, while viable HIV-1-infected target cells were determined as eFluor670+ eFluor450- Aquavidin- GFP+ cells. **(A)** Data shown are the results of at least 5 independent experiments +/- SEM. ADCC was measured using PBMCs from three different healthy donors using the formula presented in Fig.3B. The different symbols depicted in the figure represent the three different donors used. Statistical significance was tested using a Mann-Whitney test (** p< 0,01, ns : non-significant). **(B)** Data shown represent the percentage of ADCC-mediated killing obtained in a single experiment with the same PBMCs donor.

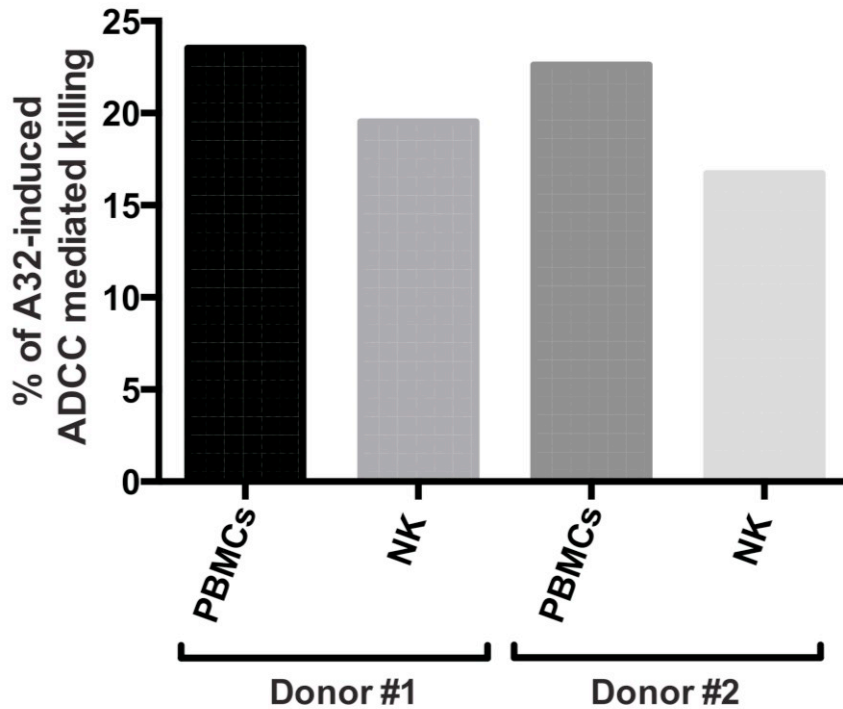


Figure 5 Comparison of the ADCC response mediated by PBMCs and purified NK cells.

The ADCC assay was performed as described in Fig.2 with the ADCC-mediating mAb A32 using 1×10^5 cells coated with gp120 as target cells and 1×10^6 PBMCs or 1×10^5 purified NK cells as effector cells. Data shown represents the percentage of ADCC-mediated killing obtained in a single experiment with two different PBMCs/NK cell donors.

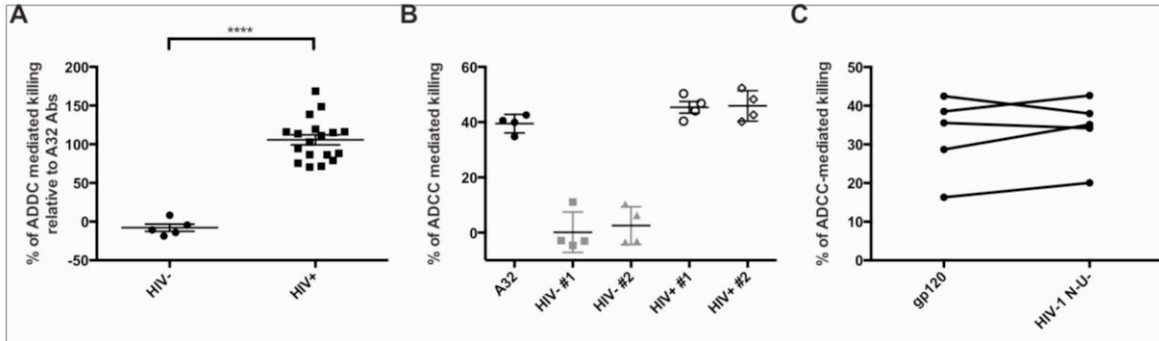


Figure 6. ADCC killing mediated by sera from individuals infected or not with HIV-1 (A)

The ADCC assay was performed as described in Fig.2, with the ADCC-mediating A32 mAb, sera from five healthy subjects (HIV-) and eighteen individuals infected with HIV-1 (HIV+), using gp120-coated target cells. ADCC was measured using PBMCs from a unique donor in at least three experiments. The percentage of ADCC-mediated killing induced by human sera was normalized to the ADCC-mediated killing induced by the A32 mAbs in each experiment. Statistical significance was tested using a unpaired t-test (**** $p < 0,0001$). (B) To test the reproducibility of the assay, ADCC was performed using A32, sera from two healthy subjects (HIV-) and two individuals infected with HIV-1 (HIV+) in four consecutive assays using the same healthy PBMCs donor. (C) Data shown represent paired values of HIV+ sera-mediated ADCC against cells coated with gp120 or infected with HIV-1 lacking Nef and Vpu (N-U-). Statistical significance was tested using a Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

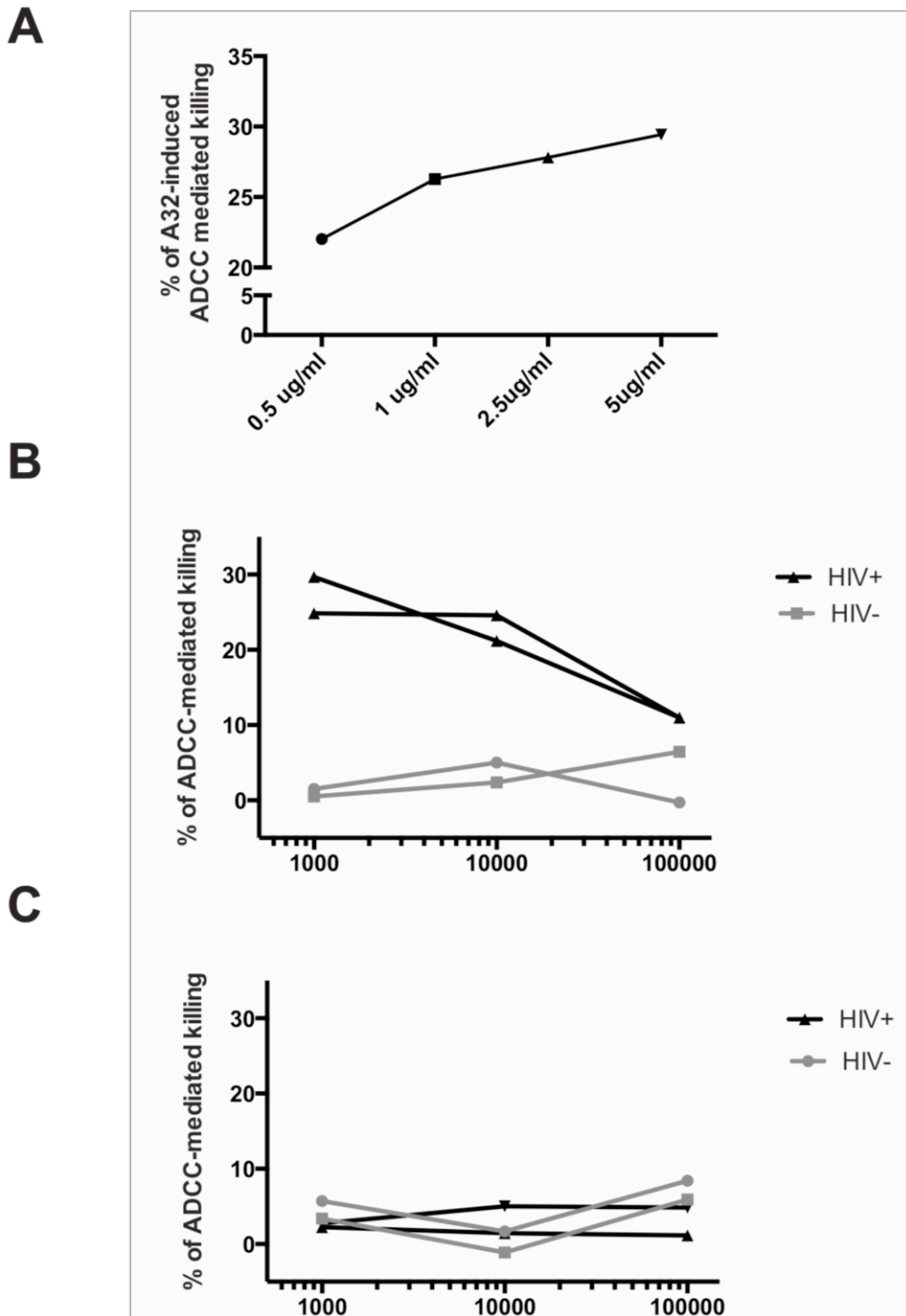


Figure S1. ADCC responses detection with decreased concentrations of ADCC-mediating antibody or increased dilutions of human sera. The ADCC assay was performed as described in Fig.2 with decreasing concentrations of the ADCC-mediating A32

mAb (A) or increasing dilutions of sera from individual infected or not with HIV-1 (B-C), using cells coated (A-B) or not (C) with HIV-1 recombinant gp120 as target cells and PBMCs as effector cells.

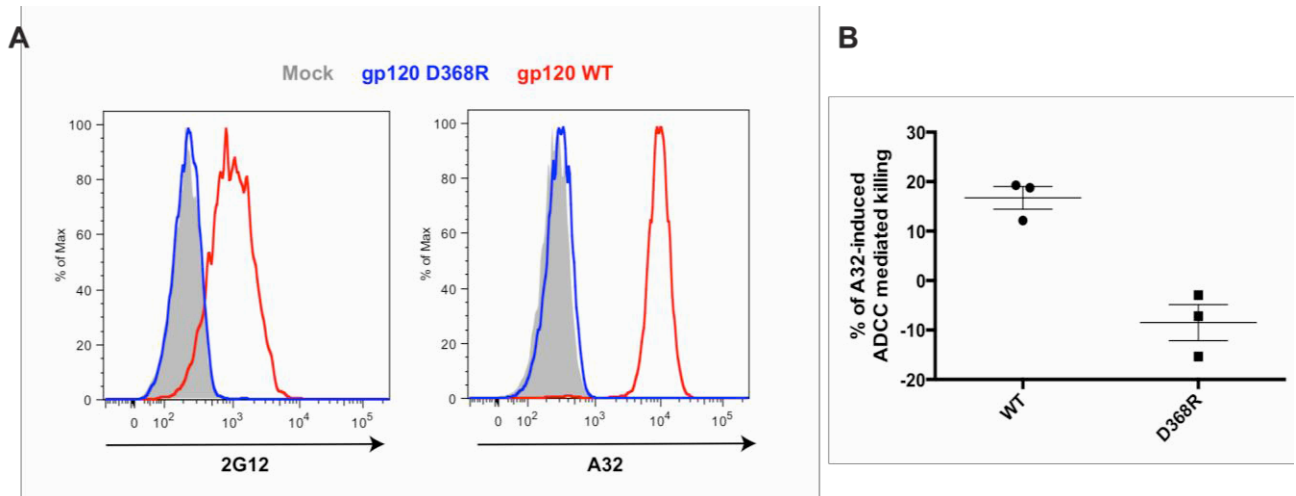


Figure S2. HIV-1 gp120 must interact with CD4 in order to bind target cells and mediate an ADCC response. (A) The ability of HIV-1 recombinant gp120 wild-type (WT) or a CD4 binding site gp120 variant that is not longer able to interact with CD4 (D368R), to bind target cells was evaluated by flow cytometry using the anti-gp120 2G12 or A32 mAbs and appropriate secondary mAbs. (B) The ADCC assay was performed as described in Fig.2 with the ADCC-mediating A32 mAb at 5 μ g/ml, using cells coated with HIV-1 recombinant gp120 WT or D368R as target cells.

References:

- Ahmad, A., Morisset, R., Thomas, R. and Menezes, J., 1994. Evidence for a defect of antibody-dependent cellular cytotoxic (ADCC) effector function and anti-HIV gp120/41-specific ADCC-mediating antibody titres in HIV-infected individuals. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 7, 428-37.
- Alpert, M.D., Harvey, J.D., Lauer, W.A., Reeves, R.K., Piatak, M., Jr., Carville, A., Mansfield, K.G., Lifson, J.D., Li, W., Desrosiers, R.C., Johnson, R.P. and Evans, D.T., 2012. ADCC develops over time during persistent infection with live-attenuated SIV and is associated with complete protection against SIV(mac)251 challenge. *PLoS pathogens* 8, e1002890.
- Baum, L.L., Cassutt, K.J., Knigge, K., Khattri, R., Margolick, J., Rinaldo, C., Kleeberger, C.A., Nishanian, P., Henrard, D.R. and Phair, J., 1996. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* 157, 2168-73.
- Bonsignori, M., Pollara, J., Moody, M.A., Alpert, M.D., Chen, X., Hwang, K.K., Gilbert, P.B., Huang, Y., Gurley, T.C., Kozink, D.M., Marshall, D.J., Whitesides, J.F., Tsao, C.Y., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Rerks-Ngarm, S., Kim, J.H., Michael, N.L., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., Lewis, G.K., Devico, A., Evans, D.T., Ferrari, G., Liao, H.X. and Haynes, B.F., 2012. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating Antibodies from an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial Target Multiple Epitopes and Preferentially Use the VH1 Gene Family. *Journal of virology* 86, 11521-32.

- Chung, A.W., Isitman, G., Navis, M., Kramski, M., Center, R.J., Kent, S.J. and Stratov, I., 2011. Immune escape from HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7505-10.
- Chung, A.W., Rollman, E., Center, R.J., Kent, S.J. and Stratov, I., 2009. Rapid degranulation of NK cells following activation by HIV-specific antibodies. *J Immunol* 182, 1202-10.
- Desormeaux, A., Coutu, M., Medjahed, H., Pacheco, B., Herschhorn, A., Gu, C., Xiang, S.H., Mao, Y., Sodroski, J. and Finzi, A., 2013. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *Journal of virology* 87, 2549-62.
- Finzi, A., Xiang, S.H., Pacheco, B., Wang, L., Haight, J., Kassa, A., Danek, B., Pancera, M., Kwong, P.D. and Sodroski, J., 2010. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Molecular cell* 37, 656-67.
- Gomez-Roman, V.R., Florese, R.H., Patterson, L.J., Peng, B., Venzon, D., Aldrich, K. and Robert-Guroff, M., 2006. A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 308, 53-67.
- Guan, Y., Pazgier, M., Sajadi, M.M., Kamin-Lewis, R., Al-Darmarki, S., Flinko, R., Lovo, E., Wu, X., Robinson, J.E., Seaman, M.S., Fouts, T.R., Gallo, R.C., DeVico, A.L. and Lewis, G.K., 2013. Diverse specificity and effector function among human antibodies to HIV-1 envelope glycoprotein epitopes exposed by CD4 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E69-78.

Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., Liao, H.X., DeVico, A.L., Lewis, G.K., Williams, C., Pinter, A., Fong, Y., Janes, H., DeCamp, A., Huang, Y., Rao, M., Billings, E., Karasavvas, N., Robb, M.L., Ngauy, V., de Souza, M.S., Paris, R., Ferrari, G., Bailer, R.T., Soderberg, K.A., Andrews, C., Berman, P.W., Frahm, N., De Rosa, S.C., Alpert, M.D., Yates, N.L., Shen, X., Koup, R.A., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Rerks-Ngarm, S., Michael, N.L. and Kim, J.H., 2012. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *The New England journal of medicine* 366, 1275-86.

Howell, D.N., Andreotti, P.E., Dawson, J.R. and Cresswell, P., 1985. Natural killing target antigens as inducers of interferon: studies with an immunoselected, natural killing-resistant human T lymphoblastoid cell line. *J Immunol* 134, 971-6.

Kamya, P., Boulet, S., Tsoukas, C.M., Routy, J.P., Thomas, R., Cote, P., Boulassel, M.R., Baril, J.G., Kovacs, C., Migueles, S.A., Connors, M., Suscovich, T.J., Brander, C., Tremblay, C.L. and Bernard, N., 2011. Receptor-ligand requirements for increased NK cell polyfunctional potential in slow progressors infected with HIV-1 coexpressing KIR3DL1**h*/**y* and HLA-B*57. *Journal of virology* 85, 5949-60.

Kantakamalakul, W., Pattanapanyasat, K., Jongrakthaitae, S., Assawadarachai, V., Ampol, S. and Sutthent, R., 2006. A novel EGFP-CEM-NK_r flow cytometric method for measuring antibody dependent cell mediated-cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-1 infected individuals. *Journal of immunological methods* 315, 1-10.

Koup, R.A., Sullivan, J.L., Levine, P.H., Brewster, F., Mahr, A., Mazzara, G., McKenzie, S. and Panicali, D., 1989. Antigenic specificity of antibody-dependent cell-mediated

cytotoxicity directed against human immunodeficiency virus in antibody-positive sera. *Journal of virology* 63, 584-90.

Kramski, M., Parsons, M.S., Stratov, I. and Kent, S.J., 2013. HIV-specific antibody immunity mediated through NK cells and monocytes. *Current HIV research* 11, 388-406.

Kramski, M., Schorcht, A., Johnston, A.P., Lichtfuss, G.F., Jegaskanda, S., De Rose, R., Stratov, I., Kelleher, A.D., French, M.A., Center, R.J., Jaworowski, A. and Kent, S.J., 2012. Role of monocytes in mediating HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 384, 51-61.

Lewis, G.K., 2013. Qualitative and quantitative variables that affect the potency of Fc-mediated effector function in vitro and in vivo: considerations for passive immunization using non-neutralizing antibodies. *Current HIV research* 11, 354-64.

Lyerly, H.K., Reed, D.L., Matthews, T.J., Langlois, A.J., Ahearne, P.A., Petteway, S.R., Jr. and Weinhold, K.J., 1987. Anti-GP 120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC. *AIDS research and human retroviruses* 3, 409-22.

Madhavi, V., Navis, M., Chung, A.W., Isitman, G., Wren, L.H., De Rose, R., Kent, S.J. and Stratov, I., 2013. Activation of NK cells by HIV-specific ADCC antibodies: role for granulocytes in expressing HIV-1 peptide epitopes. *Human vaccines & immunotherapeutics* 9, 1011-8.

Moore, J.P., Willey, R.L., Lewis, G.K., Robinson, J. and Sodroski, J., 1994. Immunological evidence for interactions between the first, second, and fifth conserved domains of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 68, 6836-47.

Peretz, Y., Ndongala, M.L., Boulet, S., Boulassel, M.R., Rouleau, D., Cote, P., Longpre, D., Routy, J.P., Falutz, J., Tremblay, C., Tsoukas, C.M., Sekaly, R.P. and Bernard, N.F., 2007. Functional T cell subsets contribute differentially to HIV peptide-specific responses within infected individuals: correlation of these functional T cell subsets with markers of disease progression. *Clin Immunol* 124, 57-68.

Pereyra, F., Jia, X., McLaren, P.J., Telenti, A., de Bakker, P.I., Walker, B.D., Ripke, S., Brumme, C.J., Pulit, S.L., Carrington, M., Kadie, C.M., Carlson, J.M., Heckerman, D., Graham, R.R., Plenge, R.M., Deeks, S.G., Gianniny, L., Crawford, G., Sullivan, J., Gonzalez, E., Davies, L., Camargo, A., Moore, J.M., Beattie, N., Gupta, S., Crenshaw, A., Burt, N.P., Guiducci, C., Gupta, N., Gao, X., Qi, Y., Yuki, Y., Piechocka-Trocha, A., Cutrell, E., Rosenberg, R., Moss, K.L., Lemay, P., O'Leary, J., Schaefer, T., Verma, P., Toth, I., Block, B., Baker, B., Rothchild, A., Lian, J., Proudfoot, J., Alvino, D.M., Vine, S., Addo, M.M., Allen, T.M., Altfeld, M., Henn, M.R., Le Gall, S., Streeck, H., Haas, D.W., Kuritzkes, D.R., Robbins, G.K., Shafer, R.W., Gulick, R.M., Shikuma, C.M., Haubrich, R., Riddler, S., Sax, P.E., Daar, E.S., Ribaud, H.J., Agan, B., Agarwal, S., Ahern, R.L., Allen, B.L., Altidor, S., Altschuler, E.L., Ambardar, S., Anastos, K., Anderson, B., Anderson, V., Andrad, U., Antoniskis, D., Bangsberg, D., Barbaro, D., Barrie, W., Bartczak, J., Barton, S., Basden, P., Basgoz, N., Bazner, S., Bellos, N.C., Benson, A.M., Berger, J., Bernard, N.F., Bernard, A.M., Birch, C., Bodner, S.J., Bolan, R.K., Boudreaux, E.T., Bradley, M., Braun, J.F., Brndjar, J.E., Brown, S.J., Brown, K., Brown, S.T., Burack, J., Bush, L.M., Cafaro, V., Campbell, O., Campbell, J., Carlson, R.H., Carmichael, J.K., Casey, K.K., Cavacuiti, C., Celestin, G., Chambers, S.T., Chez, N., Chirch, L.M., Cimoch, P.J., Cohen, D., Cohn, L.E.,

Conway, B., Cooper, D.A., Cornelson, B., Cox, D.T., Cristofano, M.V., Cuchural, G., Jr., Czartoski, J.L., Dahman, J.M., Daly, J.S., Davis, B.T., Davis, K., Davod, S.M., DeJesus, E., Dietz, C.A., Dunham, E., Dunn, M.E., Ellerin, T.B., Eron, J.J., Fangman, J.J., Farel, C.E., Ferlazzo, H., Fidler, S., Fleenor-Ford, A., Frankel, R., Freedberg, K.A., French, N.K., Fuchs, J.D., Fuller, J.D., Gaberman, J., Gallant, J.E., Gandhi, R.T., Garcia, E., Garmon, D., Gathe, J.C., Jr., Gaultier, C.R., Gebre, W., Gilman, F.D., Gilson, I., Goepfert, P.A., Gottlieb, M.S., Goulston, C., Groger, R.K., Gurley, T.D., Haber, S., Hardwicke, R., Hardy, W.D., Harrigan, P.R., Hawkins, T.N., Heath, S., Hecht, F.M., Henry, W.K., Hladek, M., Hoffman, R.P., Horton, J.M., Hsu, R.K., Huhn, G.D., Hunt, P., Hupert, M.J., Illeman, M.L., Jaeger, H., Jellinger, R.M., John, M., Johnson, J.A., Johnson, K.L., Johnson, H., Johnson, K., Joly, J., Jordan, W.C., Kauffman, C.A., Khanlou, H., Killian, R.K., Kim, A.Y., Kim, D.D., Kinder, C.A., Kirchner, J.T., Kogelman, L., Kojic, E.M., Korthuis, P.T., Kurisu, W., Kwon, D.S., LaMar, M., Lampiris, H., Lanzafame, M., Lederman, M.M., Lee, D.M., Lee, J.M., Lee, M.J., Lee, E.T., Lemoine, J., Levy, J.A., Llibre, J.M., Liguori, M.A., Little, S.J., Liu, A.Y., Lopez, A.J., Loutfy, M.R., Loy, D., Mohammed, D.Y., Man, A., Mansour, M.K., Marconi, V.C., Markowitz, M., Marques, R., Martin, J.N., Martin, H.L., Jr., Mayer, K.H., McElrath, M.J., McGhee, T.A., McGovern, B.H., McGowan, K., McIntyre, D., McLeod, G.X., Menezes, P., Mesa, G., Metroka, C.E., Meyer-Olson, D., Miller, A.O., Montgomery, K., Mounzer, K.C., Nagami, E.H., Nagin, I., Nahass, R.G., Nelson, M.O., Nielsen, C., Norene, D.L., O'Connor, D.H., Ojikutu, B.O., Okulicz, J., Oladehin, O.O., Oldfield, E.C., 3rd, Olender, S.A., Ostrowski, M., Owen, W.F., Jr., Pae, E., Parsonnet, J., Pavlatos, A.M., Perlmutter, A.M., Pierce, M.N., Pincus, J.M., Pisani, L.,

Price, L.J., Proia, L., Prokesch, R.C., Pujet, H.C., Ramgopal, M., Rathod, A., Rausch, M., Ravishankar, J., Rhame, F.S., Richards, C.S., Richman, D.D., Rodes, B., Rodriguez, M., Rose, R.C., 3rd, Rosenberg, E.S., Rosenthal, D., Ross, P.E., Rubin, D.S., Rumbaugh, E., Saenz, L., Salvaggio, M.R., Sanchez, W.C., Sanjana, V.M., Santiago, S., Schmidt, W., Schuitemaker, H., Sestak, P.M., Shalit, P., Shay, W., Shirvani, V.N., Silebi, V.I., Sizemore, J.M., Jr., Skolnik, P.R., Sokol-Anderson, M., Sosman, J.M., Stabile, P., Stapleton, J.T., Starrett, S., Stein, F., Stellbrink, H.J., Stermann, F.L., Stone, V.E., Stone, D.R., Tambussi, G., Taplitz, R.A., Tedaldi, E.M., Telenti, A., Theisen, W., Torres, R., Tosiello, L., Tremblay, C., Tribble, M.A., Trinh, P.D., Tsao, A., Ueda, P., Vaccaro, A., Valadas, E., Vanig, T.J., Vecino, I., Vega, V.M., Veikley, W., Wade, B.H., Walworth, C., Wanidworanun, C., Ward, D.J., Warner, D.A., Weber, R.D., Webster, D., Weis, S., Wheeler, D.A., White, D.J., Wilkins, E., Winston, A., Wlodaver, C.G., van't Wout, A., Wright, D.P., Yang, O.O., Yurdin, D.L., Zabukovic, B.W., Zachary, K.C., Zeeman, B. and Zhao, M., 2010. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330, 1551-7.

Pham, T.N., Lukhele, S., Hajjar, F., Routy, J.P. and Cohen, E.A., 2014. HIV Nef and Vpu protect HIV-infected CD4⁺ T cells from antibody-mediated cell lysis through down-modulation of CD4 and BST2. *Retrovirology* 11, 15.

Pollara, J., Hart, L., Brewer, F., Pickeral, J., Packard, B.Z., Hoxie, J.A., Komoriya, A., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Roederer, M., Huang, Y., Weinhold, K.J., Tomaras, G.D., Haynes, B.F., Montefiori, D.C. and Ferrari, G., 2011. High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses.

Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology 79, 603-12.

Richard, J., Sindhu, S., Pham, T.N., Belzile, J.P. and Cohen, E.A., 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115, 1354-63.

Smalls-Mantey, A., Connors, M. and Sattentau, Q.J., 2013. Comparative efficiency of HIV-1-infected T cell killing by NK cells, monocytes and neutrophils. *PloS one* 8, e74858.

Smalls-Mantey, A., Doria-Rose, N., Klein, R., Patamawenu, A., Migueles, S.A., Ko, S.Y., Hallahan, C.W., Wong, H., Liu, B., You, L., Scheid, J., Kappes, J.C., Ochsenbauer, C., Nabel, G.J., Mascola, J.R. and Connors, M., 2012. Antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary HIV-infected CD4+ T cells is directly associated with the magnitude of surface IgG binding. *Journal of virology* 86, 8672-80.

Stratov, I., Chung, A. and Kent, S.J., 2008. Robust NK cell-mediated human immunodeficiency virus (HIV)-specific antibody-dependent responses in HIV-infected subjects. *Journal of virology* 82, 5450-9.

Tyler, D.S., Stanley, S.D., Nastala, C.A., Austin, A.A., Bartlett, J.A., Stine, K.C., Lysterly, H.K., Bolognesi, D.P. and Weinhold, K.J., 1990. Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV-1 infection. Humoral and cellular defects. *J Immunol* 144, 3375-84.

Veillette, M., Desormeaux, A., Medjahed, H., Gharsallah, N.E., Coutu, M., Baalwa, J., Guan, Y., Lewis, G., Ferrari, G., Hahn, B.H., Haynes, B.F., Robinson, J.E., Kaufmann, D.E., Bonsignori, M., Sodroski, J. and Finzi, A., 2014. Interaction with cellular CD4 exposes

HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

Journal of virology 88, 2633-44.