

Université de Montréal

**Caractérisation des lymphocytes T CD4 spécifiques au  
VIH chez les donneurs non-infectés**

par

Audrey Daigneault

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine

Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Août 2016

© Audrey Daigneault, 2016

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation des lymphocytes T CD4 spécifiques au  
VIH chez les donneurs non-infectés**

Présenté par :

Audrey Daigneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Petronela Ancuta, Ph.D, Présidente

Dr Daniel Kaufmann, M.D. Ph.D, Directeur de recherche

Dr Ali Ahmad Ph.D, Membre du jury

## Résumé

Les réponses des cellules T CD4 (Thelper, TH) jouent un rôle clé dans l'immunité antivirale. Cependant, celles générées par l'infection au VIH et les vaccins candidats sont variables. Des données chez la souris et l'humain suggèrent que des réponses TH antivirales peuvent être générées avant l'exposition à l'antigène spécifique par réaction croisée avec d'autres microorganismes et influencer les réponses TH ultérieures. Les réponses TH au VIH chez des individus séronégatifs seront investiguées et comparées à celles de sujets infectés. Une haute prévalence de réponses TH prolifératives au VIH a été observée chez des sujets VIH-. Gag montre une légère prédominance sur les autres protéines du VIH Env, Nef et Pol (33% des donneurs VIH- ont une réponse contre Gag >1% par test CFSE), mais qui diffère de l'immunodominance observée chez les donneurs VIH+. Malgré les réponses prolifératives plus petites chez les donneurs VIH-, des lignées cellulaires de TH spécifiques pour Gag ou Env ont pu être générées. Un marquage intracellulaire a validé leur spécificité et leurs fonctions montrant des réponses dominées par l'expression de TNF et CD40L comparativement à celles dérivées de donneurs VIH+ produisant beaucoup d'IFN- $\gamma$ . L'affinité antigénique varie chez les sujets VIH-, mais peut être améliorée chez certains donneurs en optimisant la présentation antigénique. Une cartographie d'épitopes pour Env gp41 à identifier des épitopes reconnus par les TH. Les résultats montrent la présence de TH spécifiques au VIH chez une proportion de donneurs séronégatifs. Ces cellules pourraient influencer le développement de réponses vaccinales et spécifique au VIH durant l'infection aiguë.

**Mots-clés** : VIH, cellule T CD4, Gp41, cartographie d'épitopes, lignée cellulaire

## **Abstract**

CD4<sup>+</sup> T cell (Thelper, TH) responses play a key role in antiviral immunity. However, HIV-specific TH responses generated either by infection or by vaccine candidates are highly variable. Studies in mice and humans suggest that antiviral TH responses can be generated before exposure to the specific viral pathogen through cross-reactivity with other microorganisms. These pre-existing responses may influence development of TH responses upon pathogen or immunogen exposure. We investigated HIV-specific TH responses in HIV-uninfected individuals (UD) and compared them to those of HIV-infected donors (HI). The prevalence of HIV-specific proliferative TH responses in UD was surprisingly high: 33% of UD had a robust Gag response >1% by CFSE assay. While Gag was more frequently targeted than the alternative HIV proteins Env, Nef and Pol, we did not observe the strong Gag immunodominance pattern seen in HI. Proliferative responses were overall lower in UD than HI, but strong expansion was occasionally observed. We derived Gag- and Env-specific short-term TH cell lines from UD and used intracellular staining to confirm their specificity and functions. TNF- $\alpha$  and CD40L dominated TH responses in UD lines, contrasting with HI lines that were robust IFN- $\gamma$  producers. Functional affinity in UD was variable and could be improved in some subjects by optimization of antigen presentation. Gp41 epitope mapping identified peptides recognized by TH from UD. The results show that functional HIV-specific CD4 T cells exist in a substantial proportion of UD. Such pre-existing CD4 T cell could impact development of virus-specific TH responses at the time of acute HIV infection and influence responses to vaccine candidates.

**Keywords** : HIV, CD4 Thelper cells, cross-reactive responses, gp41, epitope mapping, pre-immune repertoire

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1. Le VIH.....	1
1.1 Incidence et mode de transmission du VIH.....	1
1.2 Classification.....	1
1.3 Structure du VIH.....	2
1.3.1 Structure de la particule virale.....	2
1.3.2 Structure du génome viral.....	4
1.4 Principales protéines du VIH.....	5
1.4.1 Env.....	5
1.4.2 Gag.....	5
1.4.3 Pol.....	6
1.4.4 Les protéines accessoires.....	6
1.5 Le cycle de réplication.....	9
1.6 La pathogénèse.....	12
1.6.1 La phase aiguë.....	13
1.6.2 La phase chronique asymptomatique.....	14
1.6.3 La phase du SIDA.....	17
1.7 Les traitements antirétroviraux.....	18
2. Les réponses immunitaires.....	21
2.1 Les réponses des cellules T CD4.....	21
2.1.1 La spécificité des récepteurs.....	22
2.1.2 La présentation d'antigènes.....	23

2.2	Les réponses immunitaire contre le VIH .....	25
2.2.1	Chez des individus séropositifs.....	25
2.2.2	Chez des individus séronégatifs.....	30
3.	Les vaccins contre le VIH.....	36
3.1	Les types de vaccin .....	36
3.2	Les stratégies utilisées.....	37
3.3	Les problématiques générales .....	42
	Hypothèses .....	46
	Objectifs.....	46
	Article: .....	48
	Discussion.....	100
	Conclusion .....	112
	Bibliographie.....	i

## Liste des figures

<b>Figure 1: Représentation de la structure d'un virion mature du VIH-1 .....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 2: Organisation génomique du VIH-1 .....</b>	<b>4</b>
<b>Figure 3: Représentation du cycle répliatif du VIH-1 .....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 4: Phases cliniques du VIH-1 .....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 5: Représentation d'une présentation d'antigène à une cellule T CD4.....</b>	<b>25</b>



## Liste des abréviations

3TC: lamivudine

ABC: abacavir

ADN: acide désoxyribonucléique

ALVAC: vecteur canary pox virus

APOBEC 3G: apolipo protein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNt: ARN de transfert

AZT: zidovudine

B7-1: CD80 (cluster of differentiation 80)

B7-2: CD86 (cluster of differentiation 60)

CCR5: C-C-chemokine receptor 5

CCR7: C-C-chemokine receptor 7

CD4: cluster of differentiation 4

CD8: cluster of differentiation 8

CD14: cluster of differentiation 14

CD25: cluster of differentiation 25

CD27: cluster of differentiation 27

CD28: cluster of differentiation 28

CD40: cluster of differentiation 40

CD40L: ligand of cluster of differentiation 40

CD45RA: antigen of cluster of differentiation 45

CD62L: ligand of cluster of differentiation 62

CD69: cluster of differentiation 69

CD163: cluster of differentiation 163

CDR-1: complementarity determining region 1

CDR-2: complementarity determining region 2

CDR-3: complementarity determining region 3

Cdk9: cyclin-dependant kinase 9  
CFSE: 5-(and-6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester  
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
CMV: cytomégalovirus  
CMVpp65: protéine pp65 du cytomégalovirus  
ConBgag: séquence virale du consensus B de Gag  
CPA: cellule présentatrice d'antigènes  
CPI: complexe de pré-intégration  
CPZ: chimpanzé  
CTI: complexe de transcription inverse  
CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4  
CXCR4: CXC-chemokine receptor 4  
DTG: Dolutegravir  
EC50: concentration efficace médiane  
ELISPOT: enzyme-linked immunospot  
Env: envelope  
EVG: Evitegravir  
FTC: emtricitabine  
Gag: group-specific antigen  
GALT: gut-associated lymphatic tissue  
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
Gp: glycoprotéine  
HLA: human leukocyte antigen  
HLA-DR: antigène des leucocytes humains du CMH de classe II  
HR-1: Heptad repeat 1  
HR-2: Heptad repeat 2  
ICS: intracellular staining  
IFN- $\gamma$ : interferon gamma  
IgA: Immunoglobuline A  
IgG: Immunoglobuline G  
IL-2: interleukine 2

IL-2R $\alpha$ : interleukine 2 receptor alpha  
IL-6: interleukine 6  
IL-10: interleukine 10  
IL-13: interleukine 13  
iNKR : inhibitory NK cell receptor  
INSTI: integrase strand transfer inhibitor  
Kb: kilobase  
LANL: Los Alamos National Laboratory  
LPS: lipopolysaccharide  
LTR: long terminal repeat  
MIP-1 $\alpha$ : macrophages inflammatory protein 1alpha  
MIP-1 $\beta$ : macrophages inflammatory protein 1beta  
MVA: modified vaccinia Ankara  
NCR: natural cytotoxicity receptor  
Nef: negative factor  
NES: nuclear export signal  
NK: natural killer  
NLS: nuclear localisation signal  
NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor  
NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitor  
NYVAC: vecteur modifié d'une souche de Copenhague du virus de la vaccine  
OX40: Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4  
PAMP: pathogen-associated molecular pattern  
PBMC: peripheral blood mononuclear cell  
PI: protease inhibitor  
Pol: polymerase  
p-TEFb: positive transcription elongation factor b  
RANTES: CCL5 (C-C chemokine ligand 5)  
rAd5: recombinant adénovirus serotype 5 vector  
RAL: raltegravir  
RE: reticulum endoplasmique  
Rev: regulator of expression of virion proteins

RNase H: ribonuclease H  
RRE: rev responsive element  
SIDA: syndrome de l'immunodéficience acquise  
SM: sooty mangabey  
TAPI-0: TNF-alpha-processing inhibitor-0  
TAR: transactivation response  
Tat: transactivateur de la transcription  
TCM: central memory T cell  
TCR: T cell receptor  
TDF: tenofovir disoproxil fumarate  
TEM: effector memory T cell  
TEMRA: effector memory RA T cell  
Tfh: T follicular helper cell  
Th1: type 1 T helper cell  
Th2: type 2 T helper cell  
TLR: TOLL-like receptor  
TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha  
TNF- $\beta$ : tumor necrosis factor beta  
TT: tetanus toxoid  
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

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les gens qui ont fait partie de mon laboratoire de recherche en commençant par le Dr. Daniel Kaufmann. J'aimerais te remercier de m'avoir fait confiance en me prenant comme étudiante dans ton équipe de recherche. Merci pour la qualité de la formation que tu m'as offerte et les nombreux conseils que tu m'as donnés. Merci également à notre lab manager Nathalie. Tu es toujours souriante et tu étais toujours disponible pour répondre à mes questions. J'espère un jour être une assistante de recherche aussi efficace que toi. Un autre merci à Roxanne qui m'a beaucoup aidée avec mes expériences. Merci aux autres membres du laboratoire Amy, Antigoni, Julia, Elsa et Gloria pour leur support et leur aide qu'elles ont pu amener tout au long de mon projet. Sans oublier une ancienne du laboratoire, Lucie Barblu. Tu m'as beaucoup appris et je n'aurai pu rêver avoir une meilleure formation qu'avec toi. Je me dois également de remercier la plateforme de laboratoire de niveau 3, ainsi que la plateforme de cytométrie du CRCHUM sans lesquels le projet n'aurait pu être possible. Merci au deux responsable de ces plateformes, Olfa Debbeche et Dominique Gauchat, pour leur assistance technique.

J'aimerais remercier nos collaborateurs à McGill: le Dr. Jean-Pierre Routy et son infirmière Josée Girouard. Grâce à eux le laboratoire a pu obtenir les leukaphérèses nécessaires pour effectuer les expériences. Merci également à tous les donateurs qui ont bien voulu prendre part à nos projets de recherche.

J'aimerais ensuite remercier toutes mes amies pour leur soutien. Je dois un merci très spécial à mon amie Annie. Annie tu m'as grandement aidée à garder confiance en moi tout au

long de ma maîtrise. Tu as également su me calmer lors de mes nombreux moments de stress, et ce malgré la distance qui nous sépare. Je te remercie infiniment.

Pour finir, les remerciements les plus importants vont à ma famille. Papa, Maman merci pour tout ce que vous avez fait pour moi durant ces deux années. Vous avez toujours été là pour moi lorsque j'en ai eu besoin. À ma sœur, Sabrina, merci pour la correction de mon mémoire. Sans toi il ne serait pas si beau. Merci à vous trois. Vous faites partis de ma réussite.

# **Introduction**

## **1. Le VIH**

### **1.1 Incidence et mode de transmission du VIH**

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est à l'origine d'un grand défi du domaine de la santé au niveau mondial, et ce depuis plusieurs années. Le VIH est un rétrovirus causant la perte des lymphocytes T CD4+ et une activation immunitaire chronique qui mène au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (1, 2). Selon le dernier rapport mondial de l'Onusida en 2014, 36,9 millions de personnes étaient infectées par le VIH (3) et on compte plus de 25 millions de décès depuis 1981 à la suite de maladies associées au SIDA (4, 5). Le nombre de nouvelles infections pour l'année 2014 grimpe à 2 millions. Ce nombre reste très élevé malgré la baisse de 35% enregistrée depuis 2000. Pour le moment, les traitements d'antirétroviraux permettent de prolonger la durée de vie des personnes atteintes du VIH, mais seulement 40% des gens infectés ont accès à ce traitement (3, 6).

### **1.2 Classification**

Le VIH fait partie de la famille des rétrovirus (7) et plus spécifiquement du genre *Lentivirus* (8). Le VIH est un rétrovirus dit complexe. En plus de posséder 3 gènes de base *gag* (groupe d'antigènes), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe) qu'ont les rétrovirus simples, ils possèdent aussi 6 gènes codant pour des protéines accessoires (Tat, Rev, Nef, Vpu, Vpr et Vif) (8). Il existe deux types de virus du VIH : le VIH-1 et le VIH-2 (9). Le VIH-1 est le virus à l'origine de l'épidémie du SIDA. Il a évolué à partir du virus de l'immunodéficience

simienne (VIS) du chimpanzé (VIS<sub>cpz</sub>) (8). Le VIH-2, qu'on retrouve surtout en Afrique, est moins pathogène. Il découle du VIS infectant les sooty-mangabeys (VIS<sub>sm</sub>) (10).

Le VIH-1 peut être différencié en 4 groupes : le groupe M, le groupe N, le groupe O et le groupe P. Le groupe M est celui qui est responsable de l'épidémie du VIH-1 dans le monde avec 33 millions de personnes infectées. Le groupe O, tant qu'à lui, infecte quelques dizaines de milliers de personnes en Afrique. Les groupes N et P sont présents au Cameroun, mais n'infectent que quelques personnes (8, 11).

Pour le groupe M, on retrouve 9 sous-groupes appelés clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) (11). En Amérique, c'est le clade B qui est retrouvé le plus fréquemment.

## **1.3 Structure du VIH**

### **1.3.1 Structure de la particule virale**

La représentation d'une particule virale mature du VIH-1 est illustrée dans figure 1 à la page 3. Le VIH de type 1 est un virus diploïde à ARN simple brin de polarité positive. Son génome fait 9,2 kb (12). Ce virus est un virus enveloppé et fait entre 110 et 128 nm de diamètre (13). L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique. Elle contient les protéines virales Gp41 et Gp120 qui constitue les deux sous-unités de la protéine de l'enveloppe (14).

Juste sous l'enveloppe, on y retrouve la matrice qui est composée de la protéine p17. Elle sert de coquille protectrice au virus (15). Vient ensuite la capsid. La capsid est constituée de la protéine p24 et a une forme conique. Sa longueur varie entre 100 et 120 nm et son diamètre entre 50 et 60 nm vis-à-vis la partie la plus large. On dénombre 1 500 protéines p24 dans la capsid. Elle contient les deux copies d'ARN du génome viral et quelques



protéines comme la nucléocapside (p7), la transcriptase inverse, l'intégrase et les protéines accessoires (16). La nucléocapside est une protéine associée au génome dans les virions matures. Elle permet aussi l'attachement de la transcriptase inverse et de l'intégrase au génome (17).

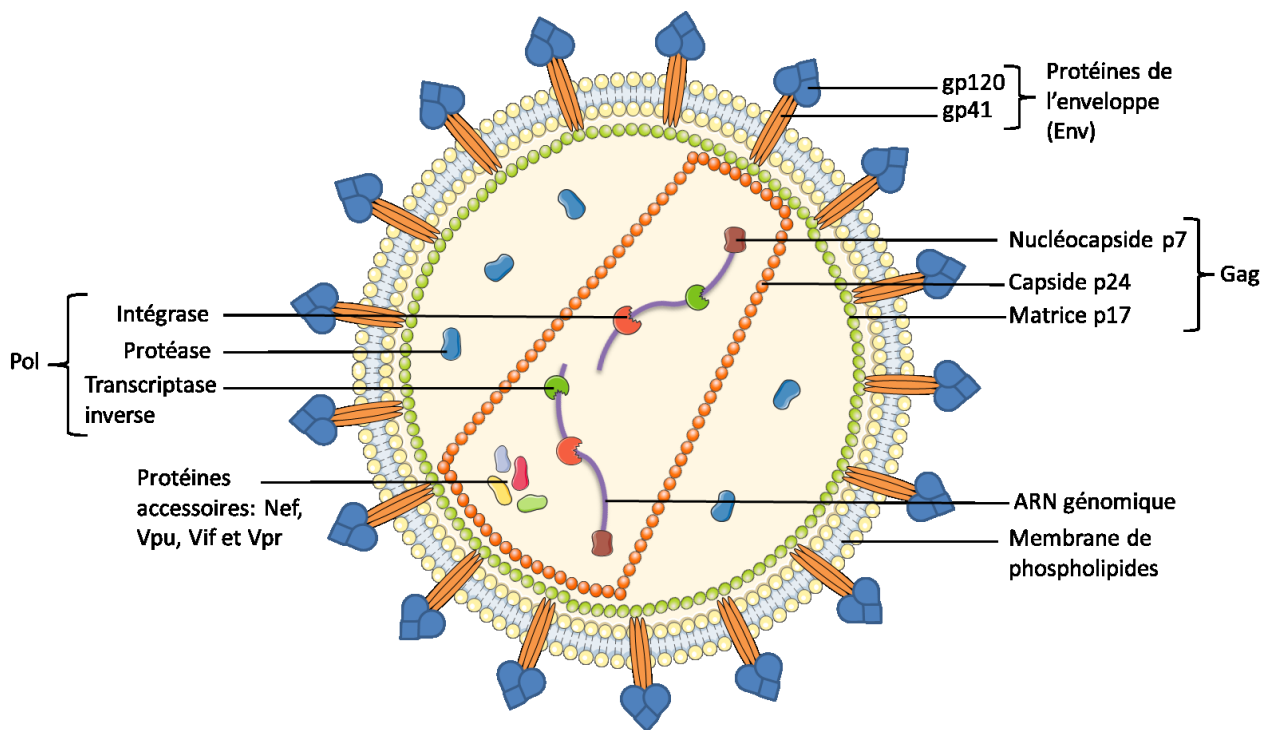


Figure 1: Représentation de la structure d'un virion mature du VIH-1

### 1.3.2 Structure du génome viral

Le génome du VIH-1 contient 9 gènes : *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* (voir le schéma de la figure 2 au bas de la page). Le gène *gag* code pour les protéines structurales p24, p17 et p7 (18). Le gène *pol* code pour les protéines enzymatiques suivantes : la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase (19). Le gène *env* va permettre la production des glycoprotéines de l'enveloppe qui comprend Gp120 et Gp41 (20).

Dans un deuxième cadre de lecture, le gène *tat* produira la protéine de transactivation de la transcription (Tat), le gène *vif* produira le facteur d'infectivité virale (Vif), le gène *vpu* produira la protéine virale U (Vpu) et le gène *nef* produira le facteur de régulation négative (Nef) (21).

Dans un troisième cadre de lecture, on y retrouve deux gènes, le gène *vpr* codant pour la protéine virale R (Vpr) et le gène *rev* codant pour la protéine régulant l'expression virale (Rev) (22). Le génome viral est aussi encadré de longues séquences terminales répétitives (LTR) pour faciliter son intégration dans le génome de la cellule hôte, ainsi que pour réguler la réplication et l'expression virale (23).

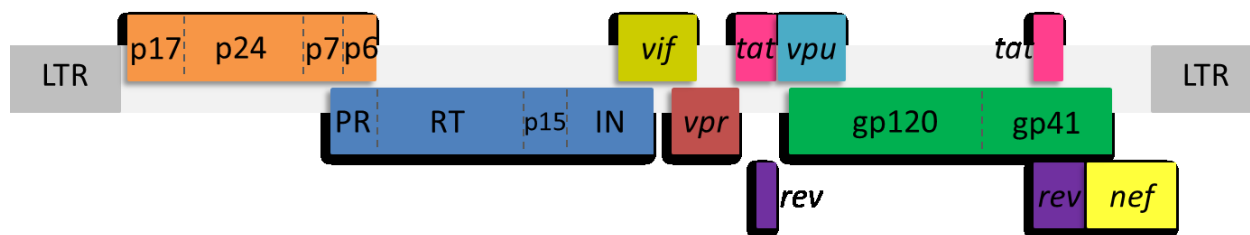


Figure 2: Organisation génomique du VIH-1

## 1.4 Principales protéines du VIH

### 1.4.1 Env

La protéine de l'enveloppe est un trimère de 441.9 KDa située à la surface du virus du VIH-1 (24). Elle contient deux sous-unités associées par des liens non-covalents que l'on nomme Gp120 et Gp41 (25). C'est deux sous-unités sont produites à la suite du clivage protéolytique du précurseur Gp160 dans le réticulum endoplasmique (RE) (20). Cette protéine détient des fonctions importantes puisque c'est elle qui va permettre l'attachement du virus à la surface de la cellule cible et la fusion avec celle-ci lors de son interaction avec la molécule CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4 (24, 26).

### 1.4.2 Gag

La protéine Gag est une polyprotéine synthétisée sous la forme de précurseur p55Gag (16). À la suite de son clivage protéolytique par la protéase virale encodée par le gène *pol* (27), les protéines de la matrice (p17), la capsid (p24) et la nucléocapsid (p7) seront formées (28). La fonction principale de la capsid est de protéger le génome viral afin d'assurer sa livraison dans la cellule cible dans des conditions optimales. Elle s'assure aussi que la transcription inverse soit efficace. Malgré ses rôles importants, elle ne constitue pas une structure très stable et symétrique, ce qui la rend difficile à explorer en détails. Toutefois, des structures recombinantes analogues à la capsid originale du virus ont été produites et nous ont permis d'obtenir la plupart des informations que nous possédons sur sa structure (16).

### 1.4.3 Pol

La protéine produite par le gène *pol* sera clivée pour produire la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase virale. La transcriptase inverse a deux fonctions enzymatiques : elle possède une activité ADN polymérase et une activité RNase H (12). Cette enzyme hétérodimérique peut autant se servir de l'ADN que de l'ARN comme matrice pour la synthèse d'ADN. Sa fidélité lors de la synthèse est assez faible, 1 mutation par 300 000 paires de base (29-31). Cela cause donc une accumulation de mutations dans le génome du VIH-1, ce qui est à l'origine de la haute diversité observée entre les différentes souches du VIH-1, ce qui cause le développement de mutations de résistance aux médicaments antiviraux ainsi qu'aux réponses immunitaires.

### 1.4.4 Les protéines accessoires

Le VIH-1 compte 4 protéines accessoires : Tat, Rev, Nef, Vpu, Vpr et Vif. Ces protéines sont nommées «accessoires», car elles ne sont pas indispensables à la réplication virale en culture cellulaire. Elles ont toutefois des rôles importants *in vivo*. Leur rôle est de permettre au virus d'échapper au système immunitaire, principalement l'immunité intrinsèque innée (32, 33). Vif, Vpu et Vpr font toutes les trois parties de la super famille des ubiquitines ligases (33).

Tat est la protéine responsable de l'activation de la transcription du génome virale, d'où son nom «trans-activator of transcription». Son rôle est de recruter le «positive transcription elongation factor b» (p-TEFb) sur le complexe de pré-initialisation. Pour ce faire, elle va interagir avec l'extrémité 5' de l'ARN viral nouvellement synthétisé. Ce fragment d'ARN possède une structure en forme d'épingle à cheveux et ce nomme TAR (trans-

activating response element). Tat va par la suite travailler avec p-TEFb pour phosphoryler le domaine C-terminal de la polymérase II afin d'augmenter le taux d'élongation de la transcription du VIH (34, 35).

La protéine Rev est impliquée dans une étape précise du cycle de réplication du VIH. Cette protéine de 20 KDa sert à exporter du noyau les ARNm des protéines structurales qui sont partiellement ou non-épissés (36). Rev va reconnaître une structure en forme d'épingle à cheveux située dans le gène *env* et s'y lier. Cette structure est appelée «Rev response element» (RRE) (37). De cette façon, les protéines de structure peuvent quitter le noyau pour être traduite dans le cytoplasme.

Vif est une protéine de 23 KDa (38). Elle a un rôle critique à jouer dans la production de virus infectieux (39). Sa principale cible est la protéine apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) qui est une cytidine désaminase cellulaire (40). Normalement, APOBEC3G est incorporé dans les virions lors de l'assemblage dans le but de causer du dommage à l'ADN du virus lors de la transcription inverse. Vif va venir interagir avec APOBEC3G et l'ubiquitiner pour entraîner sa dégradation, ce qui l'exclut des virions (32).

Vpu a un rôle plus spécialisé. Elle contrôle le mode de transmission du virus. Cette protéine de 16 KDa va interagir avec la tétherine afin de l'enlever de la membrane cellulaire (41). Tétherine est normalement présente à la membrane plasmique afin d'empêcher la relâche des nouveaux virions nouvellement synthétisés dans le milieu extracellulaire (32). L'accumulation des particules virales à l'extérieur de la cellule infectée résultera à leur transport vers des endosomes (33). Vpu va donc se lier aux nouvelles molécules tétherines

synthétisées dans l'appareil de Golgi afin de former un complexe. Téthérine sera dégradée par la suite (42). Vpu a également un deuxième rôle, soit celui de réduire l'expression de CD4 à la surface de la cellule (32). Les molécules CD4 dans le RE peuvent se lier aux molécules de l'enveloppe du VIH-1 nouvellement synthétisées, ce qui empêche les particules de l'enveloppe de se rendre à la surface cellulaire pour l'assemblage des nouveaux virions (33). Vpu recrute donc une ubiquitine ligase sur la queue cytoplasmique des molécules CD4 retenues dans le RE pour procéder à leur dégradation (41).

Une autre protéine du VIH-1 a aussi le rôle de réduire l'expression du CD4 à la surface de la cellule, ce qui montre l'importance de ce mécanisme pour la propagation virale. Nef est une protéine de 27 KDa et elle est la première protéine exprimée à la suite d'une infection. Nef va aller interagir avec la queue cytoplasmique des molécules CD4 se retrouvant dans la membrane plasmique afin d'engendrer leur endocytose qui mènera à leur dégradation (33). Cela a pour but d'éviter une surinfection des cellules, ce qui les tueraient. Cette réduction de l'expression du CD4 à la surface cellulaire permet au virus d'échapper à l'immunité adaptative en diminuant la reconnaissance par les anticorps, puisque certains d'entre eux reconnaissent la conformation que l'enveloppe aborde lorsqu'elle est liée au CD4. Nef permet également au virus de réduire l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, ce qui réduit la reconnaissance des cellules infectées par les cellules T CD8.

La dernière protéine est Vpr. Ses fonctions ne sont pas encore toutes connues, mais nous savons que cette protéine de 14 KDa (43) est impliquée dans le transport du complexe de pré-intégration (CPI) vers le noyau et dans l'arrêt du cycle en phase G<sub>2</sub> des cellules infectées (33). Elle arrête le cycle cellulaire en phase G<sub>2</sub> car à ce moment les LTR viraux sont plus actifs et donc l'expression des gènes viraux est augmentée (44).

## 1.5 Le cycle de réplication

On peut diviser le cycle de réplication du VIH-1 en deux grandes parties : la phase précoce et la phase tardive. Les étapes du cycle de réplication sont représentées dans la figure 3 à la page 11. La phase précoce débute avec l'attachement du virus à la membrane d'une cellule T CD4. Cela se fait à l'aide de la protéine gp120 qui va aller lier la molécule CD4. Cette liaison induit un changement de conformation de gp120, ce qui permet l'exposition du site de liaison au corécepteur (25). Gp120 est la protéine en charge de lier le corécepteur qui est en général soit CCR5 soit CXCR4 selon le tropisme du virus (45). L'usage plus rare de d'autres corécepteurs a été rapporté dont CCR2b, CCR3 et CCR8 (46). Cette liaison induit un changement de conformation dans gp41 ayant pour conséquence l'exposition d'une région hydrophobe appelée «peptide de fusion» (47). Les trois domaines de fusion de gp41 sont projetés dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Cela engendre la fusion du virus avec la cellule et la relâche de la capsid dans le cytoplasme.

Vient ensuite la décapsidation. La matrice du VIH-1 est phosphorylée pour pouvoir s'associer aux microfilaments d'actine. Le complexe de transcription inverse (CTI) est alors formé. Il comporte les deux brins d'ARN viral, un ARN de transfert (ARNt), la transcriptase inverse, l'intégrase et les protéines p17, p7 et Vpr (44). La transcription inverse s'effectue en même temps que la décapsidation. Le génome passe par un intermédiaire ARN-ADN, et puis l'ARN est dégradé lors de la synthèse du double brin d'ADN (16). Le complexe de pré-intégration est alors créé.

Le CPI utilise ensuite les microtubules pour migrer vers le noyau. La migration se fait à l'aide des signaux de localisation nucléaire (NLS) que portent l'intégrase et les protéines p17

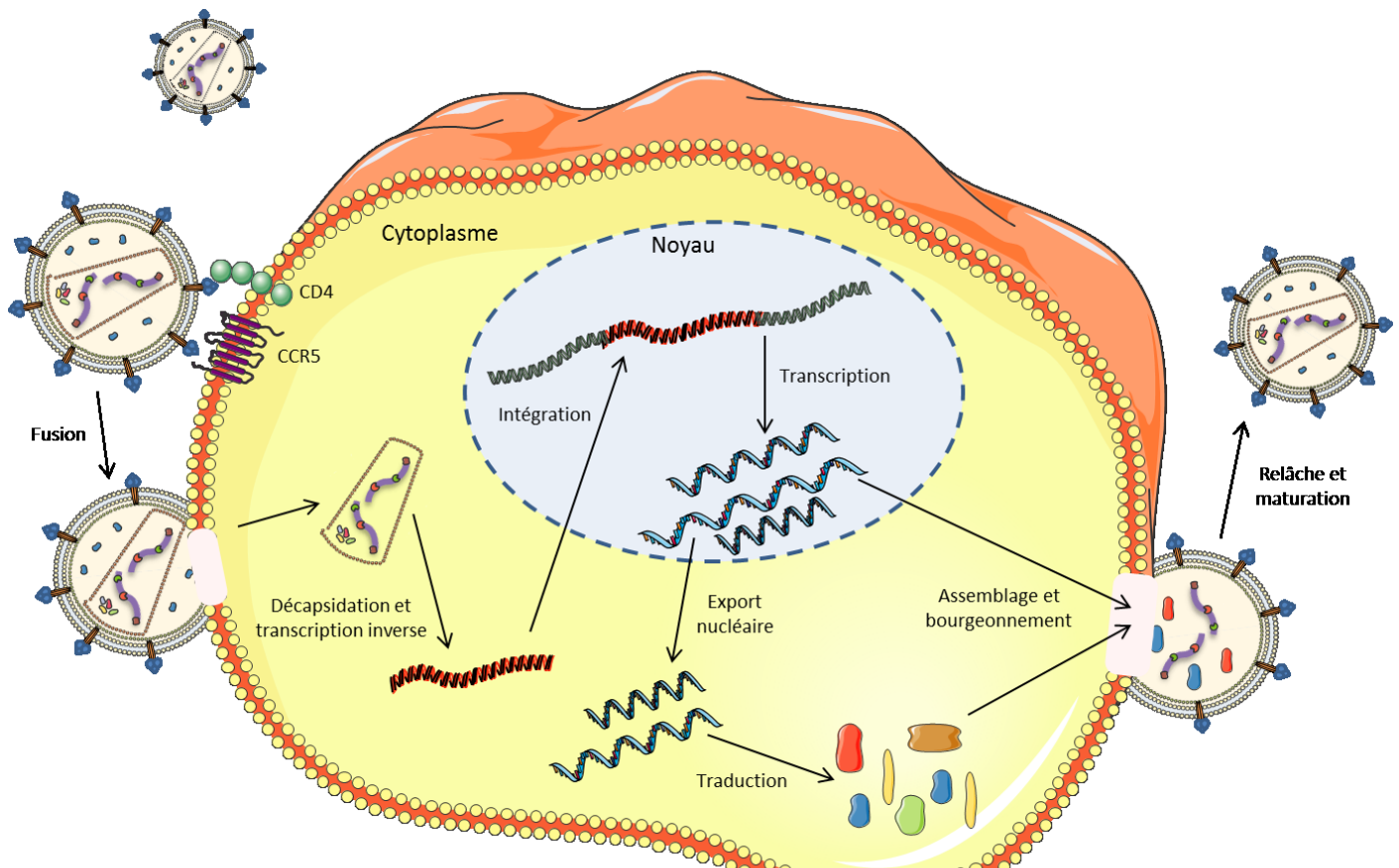
et Vpr. Une fois dans le noyau, l'ADN viral s'intègre dans le génome de la cellule avec l'aide de l'intégrase (44). Cette intégration peut s'effectuer à plusieurs locations différentes. L'intégrase enlève deux nucléotides au bout 3' de l'ADN viral afin de produire le substrat pour l'intégration. Chaque bout attaque l'ADN de la cellule en laissant cinq nucléotides entre eux. Le brin 5' de l'hôte s'apparie au brin 3' de l'ADN viral. Cette étape est aussi médiée par l'intégrase. Par la suite, la machinerie de réparation de dommage à l'ADN de la cellule vient compléter les espaces manquants et liguer le provirus à l'ADN de la cellule hôte (48).

La suite du cycle fait partie de la phase tardive, car elle implique la production de nouveaux virions. Lors de l'activation d'une cellule infectée, l'ARN polymérase II cellulaire est recruté sur le promoteur viral qui est équipé d'une boîte TATA. Le complexe de pré-initialisation s'assemble à cet endroit et la transcription débute. Cependant, l'ARN polymérase s'arrête après avoir généré un fragment d'ARN en forme d'épingle à cheveux appelé TAR. Pour continuer l'élongation, la polymérase a besoin d'être phosphorylée. La protéine virale Tat se lie donc à TAR, ce qui permet de recruter la kinase cycline dépendante 9 (Cdk9), et qui va alors phosphoryler la polymérase pour permettre la suite de l'élongation (44).

Les ARN messagers (ARNm) codant pour les protéines Nef, Tat et Rev sont rapidement transcrits et transportés dans le cytoplasme. La production rapide de Rev est importante, car les ARNm codant pour les protéines de structure ne sont pas épissés et peuvent donc être dégradés dans le noyau s'ils y restent trop longtemps. Rev se lie à la structure nommée «Rev response element» (RRE) située dans le gène *env*. Rev permet le transport des ARNm non épissés hors du noyau grâce à son site d'export nucléaire (NES) (44).



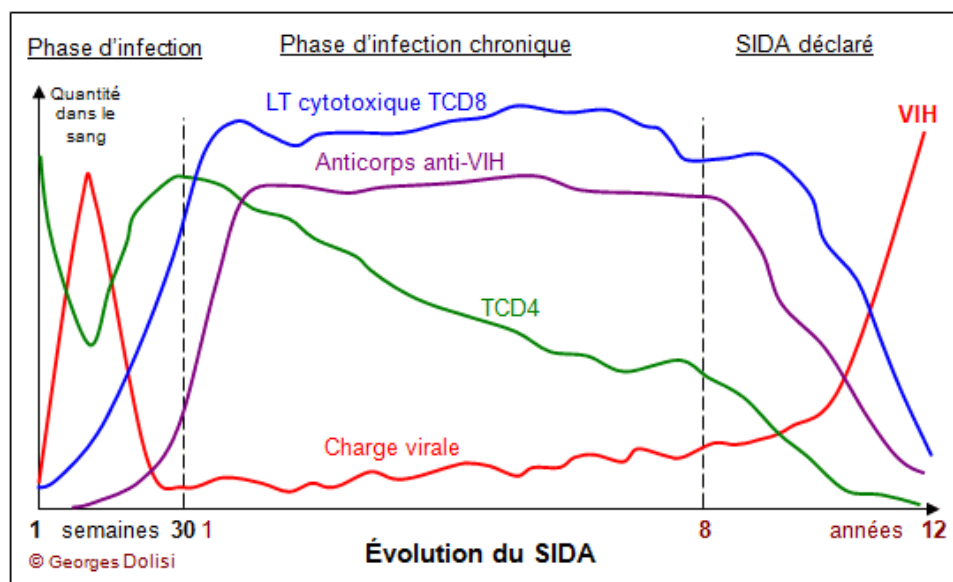
Une fois que tous les ARNm sont dans le cytoplasme et qu'ils ont été traduits en protéines, l'assemblage du virion peut commencer. L'ARN génomique fraîchement répliqué à partir du provirus s'assemble aux polyprotéines Gag et Pol (49, 50). Ce complexe se dirige ensuite vers la membrane plasmique. Il s'associe à une région riche en cholestérol et en glycolipide, car un virion dont l'enveloppe est enrichi en lipide favorise la relâche, la stabilité et la fusion (44). Lors du bourgeonnement et de la relâche du virion, les précurseurs Gag sont clivés par la protéase virale afin de générer la matrice (p17), la capside (p24) et la nucléocapside (p7) (28). La particule virale mature est alors formée.



**Figure 3: Représentation du cycle réplcatif du VIH-1**

## 1.6 La pathogénèse

L'infection au VIH survient généralement à la suite d'un transfert par les liquides biologiques comme le sang, le sperme, les sécrétions vaginales ou le lait maternel. Le virus est transporté librement dans les liquides biologiques ou par des cellules infectées. Les principaux modes de transmission sont les rapports sexuels non-protégés et les injections de drogue par intraveineuse avec du matériel souillé (51, 52). L'évolution de l'infection comprend trois phases : la phase aiguë, la phase chronique et la phase du SIDA. Les variations du taux de cellules T CD8, de cellules T CD4, d'anticorps contre le VIH et la charge virale à travers les trois différentes phases de l'infection sont illustrées dans la figure 4 ci-dessous.



**Figure 4: Phases cliniques du VIH-1**

Quelques données sur la physiopathologie du SIDA, Georges Dolisi 2016 (53)

### **1.6.1 La phase aigüe**

L'infection débute la plupart du temps par un virus R5, c'est-à-dire un virus utilisant le corécepteur CCR5. Le virus infecte en premier lieu les macrophages et les cellules dendritiques retrouvés au site d'infection (54). Pendant que les cellules dendritiques migrent dans les ganglions lymphatiques, le virus se multiplie à grande vitesse et commence à infecter les populations de cellules T CD4. Le nombre de cellules T CD4 en circulation va donc chuter et la charge virale va augmenter (55). Les cellules T CD4 mémoires résidant dans les muqueuses, entre autres dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), constituent la population principalement touchée par l'infection. Cette population exprime un haut niveau de CCR5, le corécepteur viral du VIH, et contient des cellules activées par une constante stimulation antigénique, ce qui en fait une cible de choix pour le VIH (56). Environ 10 jours à la suite de l'infection, la charge virale atteint un sommet. À ce moment, 30 à 60% des cellules T CD4 mémoires sont infectées et, dans les 4 jours suivants, 80% des cellules T CD4 mémoires vont être perdues (57). Les cellules vont mourir soit à la suite de l'effet cytopathique de la réplication du virus, soit par apoptose (56). Les lymphocytes T CD4 mémoires du GALT sont normalement plus propices à une apoptose médiée par le ligand Fas afin de contrôler l'activation et l'inflammation. Lors d'une infection par le VIH, l'exposition à une grande quantité de la protéine de l'enveloppe augmente l'expression de la molécule Fas et de son ligand chez les cellules T CD4, ce qui augmente le taux d'apoptose et résulte en une déplétion massive des cellules T CD4 mémoires au niveau des muqueuses. Cette chute de lymphocytes T CD4 est l'une des raisons qui explique pourquoi l'humain n'est pas capable de contrôler l'infection du VIH (58).

Durant cette phase, le système immunitaire s'active pour produire des cellules T cytotoxiques et des anticorps contre le VIH. Le développement d'une réponse des cellules T CD8 va réduire la charge virale (5, 59, 60). Lorsque la personne infectée a atteint une production d'anticorps anti-VIH en quantité détectable, on dit qu'elle a atteint la phase de séroconversion. Ce contrôle partiel de la virémie va réduire la charge virale et entraîner une augmentation des cellules T CD4 circulantes (61). Pendant cette phase, qui peut durer de 4 à 8 semaines, le sujet peut ressentir des symptômes apparents à ceux de la grippe ou bien rester asymptomatique. Au bout de quelques mois, la charge virale tend à se stabiliser. Ce niveau relativement stable est cependant variable d'un sujet à l'autre.

### **1.6.2 La phase chronique asymptomatique**

Cette phase est de durée variable. C'est une phase de latence clinique qui se veut asymptomatique, mais pendant laquelle l'infection persiste. En l'absence de traitement antiviral, elle varie en général entre 2 et 15 ans. Cette phase se termine lorsque le nombre de cellules T CD4 est tombé suffisamment bas pour que des microorganismes habituellement contrôlés par le système immunitaire provoquent des pathologies, ou que certaines tumeurs apparaissent à la faveur de l'immunosuppression (62). Des cas de progression sur un an jusqu'à une complication majeure menant au décès ont été décrits, alors qu'à l'autre extrême du spectre de progression, une petite minorité de sujets "elite contrôleurs" sont capables de supprimer la réplication et rester asymptomatique pendant plus de 30 ans (63-65). La charge virale plasmatique a été identifiée comme un excellent biomarqueur du risque de progression de la maladie et sert encore aujourd'hui de paramètre clé dans le suivi clinique (66).

Le système immunitaire est très actif tout au long de cette phase qui est accompagnée d'une activation immunitaire chronique. Cette activation immunitaire est en partie causée par la translocation de bactéries ou de produits microbiens de l'intestin vers le sang (67, 68). Le niveau de lipopolysaccharides (LPS), une composante majeure de la paroi des bactéries Gram négatifs, dans le sang indique le degré de translocation bactérienne (69). La déplétion des cellules T CD4 du GALT se fait pendant la phase aiguë, mais l'augmentation du niveau de LPS plasmatique n'apparaît que pendant la phase chronique. Cette translocation bactérienne accélère entre autres le processus d'athérosclérose.

Avec l'arrivée des antirétroviraux restaurant les réponses déployées par les lymphocytes T CD4, le VIH est passé d'une infection fatale à une infection chronique requérant des traitements pour le restant de la vie (62, 70). Il arrive parfois que certains individus ne parviennent pas à rétablir les réponses fournies par leurs cellules T CD4 malgré la suppression de la virémie par la trithérapie (67). Ces personnes sont plus à risque d'avoir des complications liées au SIDA ou aux agents pathogènes opportunistes. L'infection chronique, causée en partie par la virémie résiduelle laissée par la trithérapie (68), cause une inflammation chronique qui peut engendrer des complications cliniques sérieuses comme des problèmes rénaux (71), des maladies respiratoires (72) et un vieillissement prématuré du système cardiovasculaire (68). Ce vieillissement du système cardiovasculaire serait aussi accéléré par la réactivation virale du cytomégalovirus qui est souvent observée lors d'une immunosuppression. Le risque d'effectuer un infarctus du myocarde est donc augmenté. Pour ce qui est des maladies respiratoires, l'infection par le VIH induit un état d'inflammation dans les poumons et augmente le risque de développer une tuberculose. La tuberculose constitue la cause majeure de décès chez les personnes infectées par le VIH. Le VIH migre également dans

le système nerveux central tôt lors de l'infection et peut engendrer des maladies neurologiques, dont des troubles neurocognitifs tels qu'une dysfonction motrice ou de la démence à différents degrés de sévérité. Ces complications peuvent survenir à la suite de l'usage de certains antirétroviraux étant capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (73). Le VIH augmente aussi le risque d'effectuer un accident vasculaire cérébral (74). Chez les patients recevant la trithérapie, des maladies métaboliques comme la dyslipidémie (une distribution anormale du gras) (68), de l'hypertriglycémie (quantité anormalement élevée de triglycérides dans le sang) (73) et de l'ostéoporose sont à prévoir (72).

Dans les premières années les cellules perdues à la suite de l'infection peuvent être régénérées. Cependant, après plusieurs années de persistance du cycle d'infection et de mort cellulaire, une réduction graduelle du nombre de cellules T CD4 est observée (55). Puisqu'il y a de moins en moins de cellule T CD4 pour stimuler les fonctions effectrices des cellules T CD8, ces dernières ne sont plus capables de contrôler la réplication du virus (59). La réplication augmente donc, et le nombre de variants viraux chez la personne infectée s'agrandit à cause du taux élevé de mutations produites par la transcriptase inverse et de la pression exercée par les réponses immunitaires. La protéine de l'enveloppe est une protéine qui va subir de nombreuses mutations. C'est mutations vont engendrer des changements au niveau de la glycosylation de la protéine (5). L'apparition de ces variants viraux entraîne la survie des virions ayant perdu les épitopes reconnus par les cellules T CD8 ou bien ayant cachés les domaines reconnu par les anticorps neutralisants à la suite du changement de la glycosylation (60). Dans 50% des cas, le virus évoluera et son phénotype viral changera pour devenir un virus X4 (virus utilisant le corécepteur CXCR4 pour infecter les cellules) ou un

virus R5X4 (virus pouvant utiliser autant le corécepteur CCR5 que le corécepteur CXCR4 pour infecter les cellules) (26). Cela fait chuter la quantité de cellules T CD4.

### **1.6.3 La phase du SIDA**

Lorsque le taux de cellules T CD4 est à un niveau critique, la phase d'immunodéficience symptomatique, ou SIDA commence. Il n'y a pas de valeur absolue qui détermine le début de cette phase, mais la probabilité de faire des infections opportunistes majeures augmente fortement en dessous de 200 cellules/ $\mu$ l de sang. Le taux normal étant établi à plus de 500 cellules/ $\mu$ l (75). Durant cette phase, les personnes infectées sont sujettes aux infections opportunistes, à des maladies auto-immunes et à certains cancers (55). Les symptômes cliniques du patient comme les vomissements ou la diarrhée peuvent mener à différents déséquilibres électrolytiques (71). Le cytomégalovirus (CMV) est un bon exemple d'infections opportunistes, puisqu'il est réactivé chez les gens en immunosuppression, ce qui est le cas des patients atteints du SIDA. Chez ces patients, il est aussi fréquent d'observer des cancers tels que le cancer du poumon ou du foie, des lymphomes et un sarcome de Kaposi (73). Historiquement, avant la mise au point des antiviraux, la durée de la période d'immunodéficience était de 2 à 3 ans. L'immunité provenant des cellules T auxiliaires CD4 disparaissait habituellement en premier. Les réponses cytotoxiques et la production d'anticorps étaient ensuite atteintes. L'espérance de vie était de moins d'un an avant que le décès survienne à la suite des complications d'une autre pathologie (76). Aujourd'hui, avec les traitements antiviraux, la durée de vie des gens atteints par le VIH n'est que légèrement inférieure à celle des individus non-infectés (73). Il est maintenant plutôt rare de voir les gens sous médication mourir d'une infection opportuniste. Ils décéderont la plupart du temps à la suite d'une maladie associée à la vieillesse (72). Cependant, le VIH accélère la sénescence

cellulaire, ce qui signifie qu'ils souffriront de ces maladies plus tôt dans leur vie comparativement aux gens n'ayant pas le VIH.

## **1.7 Les traitements antirétroviraux**

Il n'existe pas de traitement curatif pour le VIH, car il s'agit d'une infection latente infectant des cellules à division lente, ainsi qu'à longue durée de vie, où l'ADN virale persiste puisqu'elle est intégrée au génome des cellules infectées (67). Les traitements dont nous disposons consistent en l'administration d'une trithérapie antirétrovirale. Elle permet de prolonger la vie des gens infectés, de réduire la morbidité associée au VIH, de supprimer la virémie plasmatique, de restaurer et de préserver les fonctions immunologiques, de retarder et de prévenir le développement de virus mutants résistants aux drogues et de prévenir la transmission. La trithérapie antirétrovirale pourrait également contribuer à diminuer l'inflammation et à réduire le niveau d'activation immunitaire (77).

Le premier agent antirétroviral ayant été approuvé, en 1987, est le zidovudine (AZT). Par la suite, vers la fin des années 1990, des combinaisons de thérapie antirétrovirale ont commencé à être utilisées et ont engendré une baisse importante du nombre de décès causé par le SIDA (62). Il existe aujourd'hui plus de 25 agents antirétroviraux sur le marché, répartis en 5 classes. On y retrouve en autres des inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse (NRTI), des inhibiteurs de transfert de brin pour l'intégrase (INSTI), des inhibiteurs non-nucléotidiques de la transcriptase inverse (NNRTI) et des inhibiteurs de protéase renforcés pharmacologiquement (PI). Les inhibiteurs de maturation sont une classe d'antirétroviraux plus récente et spécialisée. Ils vont interférer dans le processus de clivage entre p24 et p1 dans la polyprotéine Gag. Une combinaison de trois drogues est généralement utilisée. On y



retrouve la plupart du temps deux NRTIs combinés à une troisième drogue active d'une autre classe comme les NNRTIs, les INSTIs ou les PIs (70, 77). Les INSTIs sont une classe plus récente et sont généralement préférés aux NNRTIs et aux PIs, car ils ont une haute efficacité et un excellent profil au niveau de la sécurité et de la tolérance. Le raltegravir (RAL), l'évitegravir (EVG) et le dolutegravir (DTG) sont trois antirétroviraux récemment approuvés faisant partie de cette classe (70). Ils sont reconnus pour être particulièrement efficaces chez les patients présentant une résistance aux autres drogues. L'antirétroviral DTG est l'INSTI le plus efficace puisqu'aucun cas de résistance n'a encore été rapporté en thérapie de première ligne. Les NRTIs les plus populaires sont le tenofovir disoproxil fumarate (TDF) ou l'abacavir (ABC) en combinaison avec l'emtricitabine (FTC) ou le lamivudine (3TC) (77).

Au début des années 2000, on attendait que le patient montre des signes cliniques du SIDA ou une baisse du compte de cellules T CD4 en dessous de 200 cellules/ul de sang pour débiter le traitement (62). Les gens redoutaient le niveau de toxicité que pouvait avoir la trithérapie au niveau cardiovasculaire, cérébrovasculaire et rénal lors d'un usage prolongé. Maintenant, la trithérapie est initiée lors du diagnostic, peu importe le taux de cellules T CD4 du patient, puisqu'il a été démontré qu'elle était bénéfique et réduisait la transmission lorsqu'elle est prise sans interruption (70). La sélection du traitement est adaptée pour chaque patient et va changer en fonction de l'efficacité virologique, des effets secondaires possibles, des interférences possibles avec les autres médicaments pris par le patient, de la résistance du virus, de la fréquence du dosage et des coûts (77). Si la charge virale n'est plus supprimée, qu'un antirétroviral cause des effets secondaires ou qu'il y a interférence avec un autre médicament, la trithérapie devra être modifiée. Les effets secondaires rencontrés sont notamment une toxicité au niveau du système nerveux central, souvent associé aux NNRTIs,

et une toxicité au niveau gastro-intestinal, qui est plutôt associée à l'utilisation des PIs. Lors du développement d'une résistance aux antirétroviraux, une analyse génotypique du virus doit être effectuée afin de déterminer les mutations causant la résistance et d'adapter le traitement (70, 77).

En attendant qu'un vaccin efficace contre le VIH voie le jour, des traitements antiviraux sont administrés en tant que prophylaxie de préexposition chez les individus exposés au virus. Les antiviraux recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé pour la prophylaxie sont le TDF et le FTC (78). Plusieurs petites études ont démontré que les antiviraux étaient efficaces pour prévenir l'infection par le VIH chez des sujets sains lorsque le traitement est bien suivi (79). Par la suite, l'étude iPrEx, une étude randomisée de phase 3 réalisée sur des hommes et des transgenres ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes, a confirmé les résultats d'une étude à grande échelle en notant une diminution de 73% de l'acquisition du VIH lors de l'utilisation de la prophylaxie comparativement au placebo (80). Une autre étude, cette fois réalisée sur des couples au Ouganda et au Kenya dont l'un des partenaires est infecté par le VIH, a également démontré une réduction de 75% du taux d'infection par le VIH avec la prise d'antiviraux de façon prophylactique. Cela est très bon considérant que tous les partenaires infectés par le VIH dans cette étude n'étaient pas sous médication antivirale et donc possédaient une certaine charge virale détectable augmentant le risque de transmission. La prophylaxie comporte des risques, c'est pourquoi elle n'est administrée qu'aux personnes à risque d'infection par le VIH. Les antiviraux sont associés à une certaine toxicité chez les individus infectés par le VIH et on ne sait pas quels effets ils auront à long terme sur des personnes non-infectées (78).

## **2. Les réponses immunitaires**

### **2.1 Les réponses des cellules T CD4**

Il existe deux types principaux de cellules T: les cellules T CD4 et les cellules T CD8. La fonction effectrice des cellules T CD8 est une fonction cytotoxique, ce qui consiste à lyser les cellules infectées. Les cellules effectrices T CD4 vont, quant à elles, sécréter des cytokines afin de stimuler les fonctions effectrices des cellules T CD8 et la production d'anticorps par les cellules B, ainsi que moduler les fonctions des cellules présentatrices d'antigène. L'immunité produite par les cellules T CD4 est très importante, car elle coordonne le système immunitaire adaptatif (58, 81, 82). On dit qu'elles occupent une position centrale puisque c'est elles qui vont activer les cellules T CD8 et s'occuper du maintien des cellules T CD8 mémoire. Leur aide est aussi essentiel pour le développement d'anticorps neutralisants efficaces (59, 82) et des cellules B mémoires (81). Cela constitue une étape critique dans le développement de l'immunité adaptative. Les cellules T vont procurer une immunité par une réponse primaire des cellules naïves, qui vont proliférer et acquérir des fonctions effectrices. Quelques-unes d'entre elles vont également acquérir un phénotype mémoire. Lorsque l'agent infectieux est éliminé, les cellules effectrices vont mourir et ce n'est que les cellules mémoires antigènes spécifiques qui vont persister. Les cellules mémoires vont pouvoir procurer des fonctions effectrices immédiates si le même antigène apparaît de nouveau (83).

La fréquence des cellules T précurseurs dans le répertoire immunitaire avant l'exposition à l'antigène détermine la magnitude de la réponse immunitaire chez la souris et cela est très probablement vrai chez l'humain aussi (84-86). Plus le nombre de peptides du soi homologue à un antigène donné est petit, plus la fréquence de cellules T CD4 naïves pour ce

même antigène dans le répertoire immunitaire sera importante. Les petites populations antigènes spécifiques ont perdu les cellules avec un récepteur de cellule T (TCR) de haute affinité à cause de la délétion clonale des clones reconnaissant les peptides du soi homologues (85).

L'efficacité de l'activation des cellules T présentes dans les organes lymphoïdes secondaires va dépendre de la concentration de l'antigène qui s'y retrouve, mais également de l'affinité du TCR pour le complexe antigène-CMH (83). La réponse peut également être faible si le peptide ressemble à un peptide du soi pour lequel l'hôte est tolérant. (85)

### **2.1.1 La spécificité des récepteurs**

Le TCR est un hétérodimère contenant deux chaînes protéiques. La majorité des TCR vont exprimer les chaînes  $\alpha\beta$  mais quelques-uns vont exprimer les chaînes  $\gamma\delta$  (87). Les cellules T présentant un  $\gamma\delta$ TCR se retrouvent généralement dans la peau et les muqueuses. La fonction de ce TCR n'est pas encore très connue (84). Les TCR sont générés par des recombinaisons aléatoires des segments variable (V), diversité (D) et jonction (J). La partie la plus variable du TCR est appelée «région complémentaire déterminante» (CDR) (88). Il est divisé en trois régions : CDR-1, CDR-2 et CDR-3 (87). Chaque chaîne ( $\alpha$  et  $\beta$ ) possède ses propres CDR. Les CDR-1 et 2 vont permettre l'interaction entre le TCR et les hélices du CMH. Ceci constitue la première interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH. Par la suite, le CDR-3, qui est la région la plus variable du TCR, va changer de conformation pour s'ajuster précisément au peptide qui est présenté (89). C'est cette région qui va interagir avec le peptide présenté par la molécule du CMH (87). La spécificité du TCR est en partie

déterminée par le CDR-3, mais le CDR-1 et le CDR-2 ont aussi leurs effets. Ils vont procurer une interaction spécifique avec le peptide en altérant le contact que le CMH a avec le peptide.

Les TCR devraient être capables de lier plus d'un antigène afin de tous les reconnaître (84). Un seul TCR peut reconnaître environ un million de peptides distinct (84, 90). Le nombre de TCRs différents contenu dans le répertoire un humain est estimé théoriquement entre  $10^{12}$  et  $10^{15}$ , cependant sa diversité expérimentale se situe plus autour de  $10^8$  (90, 91). Théoriquement, avec le nombre de clones de TCR pouvant être générés par le réarrangement des gènes et les substitutions dans la région N (section entre les segments V, D et J où des nucléotides y sont insérés aléatoirement pour procurer une variabilité), il est possible de générer un TCR spécifique pour chaque peptide immunogène existant (92). Le problème est que, si un TCR liait seulement un antigène, nous n'aurions pas assez de cellules pour reconnaître tous les antigènes possibles (84). La fréquence des cellules naïves pour un antigène donné serait alors vraiment basse, ce qui ferait en sorte que la réponse immunitaire contre cet antigène serait très lente. Il faut donc trouver un compromis entre la spécificité des TCRs et la fréquence des cellules naïves dans le répertoire (92) pour être capable de reconnaître un éventail de peptides capable de monter une réponse immunitaire rapide avec la meilleure spécificité et tout en ayant une faible réactivité pour les antigènes du soi (89).

### **2.1.2 La présentation d'antigènes**

La présentation d'antigènes se fait dans les organes lymphoïdes secondaires, là où résident les cellules T naïves. Les antigènes sont présentés aux cellules T naïves par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) via le CMH de classe II, pour les cellules T CD4, ou par le CMH de classe I pour les cellules T CD8. Les cellules dendritiques sont reconnues pour

être les meilleures cellules présentatrices d'antigènes, car elles procurent un signal de costimulation aux cellules T (93). De plus, elles permettent aux cellules T de se différencier en cellule mémoire de longue durée. Les cellules T reconnaissent les antigènes, à l'aide de leur TCR, lorsqu'ils sont présentés par une molécule du CMH d'une CPA. Les corécepteurs, CD4 ou CD8, se lient aussi au CMH pour amplifier le signal intracellulaire transmis par le TCR. Ce sont eux qui déterminent la spécificité des cellules T pour le CMH de classe I ou II, car la molécule CD4 ne peut lier que le CMH de classe II et la molécule CD8 que le CMH de classe I. Lorsqu'une le TCR d'une cellule T CD4 rencontre un antigène présenté par un CMH de classe II, elle commence à exprimer la molécule CD69, le récepteur à IL-2 ( $IL-2R\alpha$ ) et le ligand de CD40 (CD40L). Le CD40L va permettre la liaison du CD40 à la surface de la CPA et ainsi augmenter l'expression des molécules de costimulation B7-1 et B7-2 sur la CPA. B7-1 ou B7-2 vont lier la molécule CD28 à la surface de la cellule T, ce qui crée le signal de costimulation et augmente la sécrétion d'IL-2 par la cellule T CD4, servant entre autre à l'activation des cellules T CD8 (83). Un schéma représentant la présentation d'un antigène à une cellule T CD4 est illustré à la figure 5 située à la page 25.

Le CMH de classe II peut présenter des peptides d'une longueur allant jusqu'à 20 acides aminés car les bouts de la poche servant à la liaison du peptide sont ouverts (94). La liaison entre le peptide et le CMH de classe II se fait cependant à l'aide d'un noyau de 9 résidus, mais plus précisément à l'aide des résidus en position 1, 4, 6 et 9 (85, 95). Le résidu 5 est le plus important pour la reconnaissance par le TCR, car le CDR3 interagit avec lui. Lorsqu'il subit une substitution par le résidu de l'alanine, la réponse des cellules T diminue de 90%. Les résidus 4 et 6 peuvent aussi affecter indirectement la spécificité en changeant la position des résidus pointant hors du CMH de classe II. Le TCR se focalise plus sur les acides

aminés qui entrent en contact avec lui que sur les acides aminés qui ancrent le peptide dans le CMH de classe II (85).

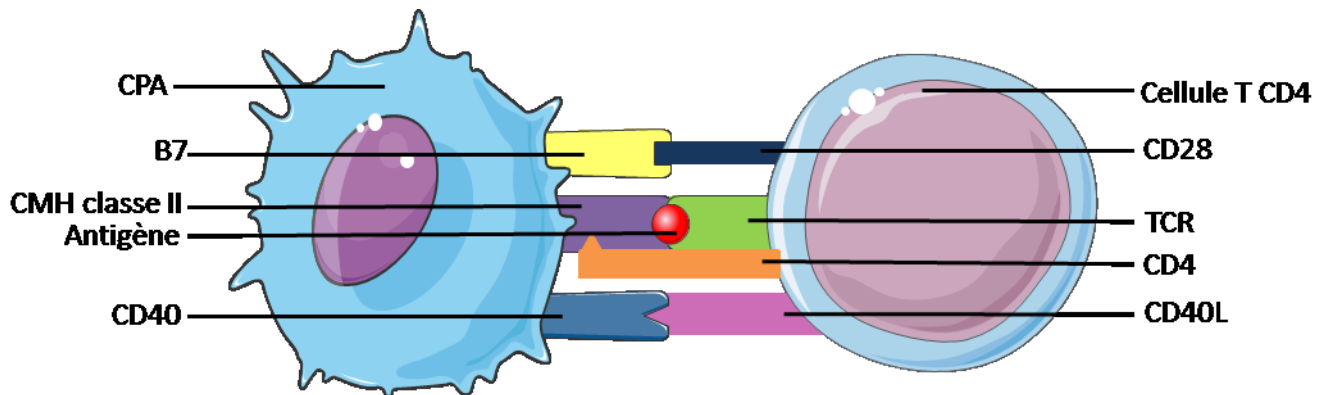


Figure 5: Représentation d'une présentation d'antigène à une cellule T CD4

## 2.2 Les réponses immunitaire contre le VIH

### 2.2.1 Chez des individus séropositifs

Comme pour tous les autres agents pathogènes, le système immunitaire monte une réponse contre le VIH pour tenter de l'éliminer. Les premières réponses vont provenir du système immunitaire inné. Le système immunitaire inné comprend les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (NK). Son rôle est de fournir une réponse rapide face aux agents pathogènes afin de donner le temps nécessaire au système immunitaire adaptatif de développer une réponse spécifique. Le système immunitaire inné

amplifie, module et soutient également la réponse immunitaire adaptative en lui fournissant les signaux de costimulation et les cytokines qu'il lui faut (96).

Les macrophages et les cellules dendritiques vont être les premiers à reconnaître le VIH. Ils le font par des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) grâce à leurs TOLL like receptors (TLR) (97). L'activation de ces récepteurs stimule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (98). De plus, elle augmente l'expression de CCR7 pour diriger les cellules vers les ganglions lymphatiques, ainsi que l'expression des molécules de costimulation. Une fois arrivés dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques et les macrophages peuvent activer l'immunité adaptative en présentant les antigènes aux cellules T CD4 à l'aide du CMH de classe II, à la suite de la phagocytose du virus (99). Ces cellules vont également contribuer en grande partie à l'inflammation chronique retrouvée lors de l'infection par le VIH (73). La translocation microbienne observée à la suite de la déplétion des cellules T CD4 de la muqueuse intestinale va engendrer l'activation de ces cellules. Lors de l'activation, des formes solubles des molécules CD14 et CD163 vont être relâchées dans le sang (68). Les molécules de LPS retrouvées dans le sang sont entre autres responsables de la relâche des molécules CD14 (69). Ces deux molécules vont jouer un rôle dans le développement de maladies cardiovasculaires.

Les cellules NK font partie de la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Elles vont lyser les cellules infectées et sécréter des cytokines immunorégulantes tel que IFN- $\gamma$ , le facteur de nécrose tumorale  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), le facteur de croissance hématopoïétique (GM-CSF) et les interleukines (IL)-10 et IL-13. Les cellules NK vont reconnaître les cellules infectées par leur baisse d'expression de molécule du CMH I. Pour ce



faire, elles possèdent des récepteurs inhibiteurs (iNKR) et des récepteurs activateurs, dont les NCR, NKG2D et NKG2C (100, 101). La balance des signaux activateurs et inhibiteurs détermine si la cellule NK enclenche le mécanisme de lyse cellulaire ou non. Dans le contexte de l'infection par le VIH, les cellules NK exercent leurs fonctions cytolytiques, mais sécrètent aussi des chimiokines de la famille C-C pour supprimer l'infection par les virions à tropisme CCR5. Les macrophage inflammatory protein (MIP)1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  et RANTES bloquent l'entrée du virus en se liant à son corécepteur CCR5 (96).

Pendant que le système immunitaire inné travaille, le système immunitaire adaptatif bâtit sa réponse. Durant la phase aiguë, les lymphocytes T CD4 sont activés par les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques. Leur activation entraîne la production de cytokines inflammatoires, dont IFN- $\gamma$  et IL-2 (58, 102). Ces cytokines aident à l'activation des lymphocytes B et T CD8. Cependant, cette activation, combinée à l'expression du corécepteur CCR5, rend les cellules T CD4 plus susceptibles à l'infection par le VIH (102). Les cellules vont donc mourir à la suite d'une trop grande infection par le VIH ou bien par l'action cytolytique des cellules T CD8. Les réponses déployées par les lymphocytes T CD4 contre le VIH sont d'une intensité très variable entre les individus (59, 82).

La première réponse du système immunitaire adaptatif provient des cellules T CD8. Les lymphocytes T CD8 sont activés par la reconnaissance d'un peptide du VIH présenté par le CMH de classe I, situé sur les cellules infectées, ainsi que par les cytokines produites par les cellules T CD4. Lorsque les cellules T CD8 sont activées, elles sécrètent les protéines perforine et granzyme A et B afin de lyser les cellules infectées et induire leur apoptose (103). Chez les personnes atteintes du VIH, on remarque une baisse de la production de perforine (55). Cela serait expliqué par un arrêt prématuré de la différenciation des cellules T CD8 à un

stade où la perforine n'est pas fortement exprimée. Seulement 5% de cellules T CD8 mémoires se différencieraient de façon terminale chez les gens infectés (103). Ces cellules contrôlent l'infection lors de la phase aiguë, mais deviennent vite inefficaces lors de l'apparition de virus mutants émergents (60). Le peu de cellules spécifiques au VIH perdent beaucoup de leur efficacité, car elles ne sont plus capables de reconnaître leur épitope. Le corps doit donc générer de nouvelles cellules T CD8 (55). Cependant, avec la baisse du nombre de cellules T CD4, le processus n'est pas aussi facile. Malgré tout, ce sont ces réponses qui vont permettre de contrôler la réplication du VIH et de retarder la progression de la maladie (93).

Durant la phase chronique de l'infection, les réponses des lymphocytes T CD4 et CD8 perdent de leur efficacité, car les cellules subissent un épuisement cellulaire. L'épuisement cellulaire est défini par une perte progressive des fonctions effectrices dans un contexte de persistance antigénique (104). Cet état peut être atteint à la suite d'une altération dans la présentation de l'antigène, dans la durée de l'exposition des cellules à l'antigène, dans la force du signallement du TCR ou dans le microenvironnement. Les cellules T CD4 sont notamment incommodées lorsqu'elles sont dans un environnement en inflammation, ce qui est observé lors de la phase chronique asymptomatique de l'infection par le VIH. Elles vont perdre leur capacité à proliférer et leur polyfonctionnalité, en particulier la production d'IL-2 (105). Ces fonctions peuvent toutefois être restaurées de façon significative par les traitements d'antirétroviraux (67). De plus, lors de cette même phase de l'infection, les cellules T sont exposées à un haut taux d'antigènes du VIH. Cela crée une dépendance pour les cellules T CD4 et CD8 spécifiques au VIH et, lorsqu'elles se retrouvent en absence d'antigènes, elles s'affaiblissent (104). Le principal marqueur de l'épuisement cellulaire est le «programmed-

death 1» (PD-1) (67). PD-1 est un corécepteur inhibiteur qui est retrouvé à la surface des cellules spécifiques au VIH montrant de l'épuisement cellulaire. Autant chez les lymphocytes T CD4 que CD8, son expression est en lien direct avec les marqueurs de progression de l'infection par le VIH comme la charge virale et le compte de CD4 (105). La trithérapie aide à réduire le niveau d'expression de PD-1, mais ne l'enlève pas complètement. Pour restaurer la prolifération et la production de cytokines, le blocage *in vitro* de PD-1 à l'aide d'un anticorps peut être utilisé (67). Un deuxième corécepteur inhibiteur a été identifié, il s'agit du «cytotoxic T-lymphocyte antigen 4» (CTLA-4) (104). CTLA-4 induit les mêmes dysfonctions cellulaires que PD-1, mais son expression est cependant restreinte aux cellules T CD4. Contrairement à PD-1, l'utilisation d'un anticorps bloquant contre CTLA-4 ne montre pas de bénéfices (106). L'expression de PD-1, CTLA-4 et d'un troisième corécepteur inhibiteur, «T cell immunoglobulin» (Tim-3), constitue le phénotype de cellules T CD4 spécifiques au VIH les plus épuisées. C'est le TNF qui serait à l'origine de l'augmentation de l'expression de ces corécepteurs inhibiteurs (105). L'augmentation de la concentration plasmatique du TNF induit une expression constante de NF- $\kappa$ B dans les cellules T CD4 qui ira par la suite activer l'expression de PD-1.

Le dernier type de réponse adaptative est la mise en place d'une réponse humorale par les lymphocytes B. La réponse humorale dominante est dirigée contre gp41 (107). Gp120 est aussi un antigène du VIH très immunogène. Les autres anticorps dirigés contre le VIH ciblent les sous-produits de Pol et Gag, dont la protéine p24. Les anticorps dirigés contre cette dernière sont utilisés pour le diagnostic de l'infection. Malheureusement, tous ces anticorps générés au début de l'infection ne sont pas neutralisants (108). Les anticorps neutralisants ne se développent que deux ou trois mois après l'infection. Pendant ce temps, les épitopes

immunodominants ont le temps de muter, comme c'est le cas avec la protéine de l'enveloppe qui effectue de nombreuses mutations.

En plus de ne pas être très efficaces, les réponses immunitaires dirigées contre le VIH peuvent être nuisibles. Par exemple, en augmentant l'endocytose des virions opsonisés par les cellules non-infectées, le système immunitaire s'infecte lui-même, et par leur fonction cytolytique, les cellules T CD8 tuent une partie du système immunitaire en éliminant les cellules T CD4 (109). De plus, le recrutement des cellules T CD4 dans les ganglions lymphatiques, dans le but d'aider à la clairance virale, fournit au VIH les cellules nécessaires pour se répliquer (55, 110). En conclusion, autant le système immunitaire à médiation cellulaire que celui à médiation humorale ne sont pas capables de contrôler l'infection par le VIH, ce qui mène à leur épuisement puis à leur destruction (111).

### **2.2.2 Chez des individus séronégatifs**

Tout comme chez les individus infectés par le VIH, les réponses des lymphocytes T CD4 contre les antigènes du VIH vont varier d'un individu à l'autre. Prenons comme exemple les essais de vaccination contre le VIH. L'étude clinique RISVAC02 a observé une réponse immunitaire contre l'antigène de l'enveloppe chez 23% de ses sujets (4), tandis que l'étude RV144 en a observé 41% (112). Les causes menant à cette variabilité au sein du même immunogène ne sont pas encore connues. Selon des études chez les souris, la reconnaissance d'un antigène par les cellules T CD8 mémoires est influencée par l'historique d'exposition aux agents pathogènes de l'individu (113). Lors d'une infection, l'immunité protectrice et l'intensité des symptômes associés à la pathologie seront influencées par les cellules mémoires

ayant été générées à la suite d'infections précédentes. Ce type d'immunité est appelé : immunité hétérologue.

L'immunité hétérologue est une immunité qui se développe contre un agent pathogène à la suite d'une exposition de l'hôte à un autre agent pathogène (89). Les deux agents pathogènes peuvent parvenir du même groupe de pathogènes ou non (virus, bactéries, parasites) et ne requiert pas une homologie complète de l'épitope reconnu par les cellules T (114). Ce type d'immunité influence également la hiérarchie des réponses des cellules T et la distribution des cellules mémoires. L'infection par un virus hétérologue peut rendre un épitope non-dominant en un épitope immunodominant par une réaction croisée (113). Il se pourrait bien qu'en réalité que les épitopes immunodominants identifiés pour différents agents pathogènes ne soient qu'en fait immunodominant puisque l'hôte a été exposé précédemment à un agent pathogène hétérologue. L'immunité hétérologue n'est cependant pas aussi efficace que l'immunité homologue où l'hôte rencontre un agent pathogène pour lequel il est déjà immunisé, mais les cellules qui en résulteront par le biais de réactions croisées seront de longues durées. Le degré d'infection chez l'hôte devrait également être moins élevé que lors d'une infection primaire sans immunité hétérologue (89). Cela veut donc dire que notre répertoire de cellules T mémoires change tout au long de notre vie. Chaque virus que nous rencontrons induit des changements au niveau des réponses produites par les lymphocytes T pour les infections à venir. Quelques exemples ont été démontrés pour le virus de l'hépatite C. Le virus de l'influenza A est entre autres reconnu pour induire des réponses immunitaires hétérologues pour un épitope de l'antigène NS3 du virus de l'hépatite C (115). Des études chez la souris, sur la mise au point d'un vaccin contre l'hépatite C, ont également permis d'observer des réponses spécifiques pour ce virus lorsque ces dernières sont immunisées avec

un vecteur d'adénovirus ne contenant aucun antigène du virus de l'hépatite C (114). L'utilisation plus fréquente de ce type de vecteur pour la génération de vaccin pourrait donc être bénéfique sur la prévalence d'infections pour certains virus lorsque des cellules à réactions croisées sont générées.

L'immunité hétérologue est un phénomène qui est également observé lors des rejets de greffe. Les cellules T mémoires peuvent réagir par réactions croisées avec les antigènes HLA du greffon et l'attaquer. Près de la moitié des cellules T spécifiques pour des antigènes viraux vont produire des réactions croisées lors de la présence d'antigènes HLA allogéniques. Généralement, ce sont les cellules mémoires qui vont créer ce genre de réactions puisqu'elles ne nécessitent pas la présence des facteurs de costimulation pour produire une réponse (116). Un groupe de recherche s'est intéressé aux causes provoquant ces réactions croisées et menant au rejet du greffon. Ils ont découvert que les cellules T CD8 participant au rejet de la greffe exprimaient l'isoforme CD45RB (117). Cet isoforme est normalement perdu lors de la différenciation des cellules naïves en cellules mémoires, mais lorsque les cellules sont activées par une interaction de faible affinité elles ne perdent pas l'expression du CD45RB. C'est l'expression de cette molécule qui va permettre aux cellules de faible affinité de mieux proliférer. L'addition d'un anticorps anti-CD45RB a d'ailleurs démontré une prolongation de la survie du greffon. Généralement l'immunité hétérologue est bénéfique pour l'être humain puisqu'elle lui procure une certaine protection contre les agents pathogènes, mais elle devient plutôt nuisible pour les individus devant recevoir une greffe d'organe.

Les réactions croisées provenant des cellules T sont une composante essentielle à l'immunité cellulaire puisque le répertoire de cellules T contient un nombre fixe de cellules. Sans les réactions croisées, l'éventail d'antigènes reconnu par le système immunitaire ne serait

pas aussi large (89, 118). Une étude sur des souris a démontré qu'en effet, des cellules T mémoires pouvaient se développer sans être exposé à leur antigène spécifique (86).

Le degré d'homologie dans la séquence de deux peptides pour activer une réaction croisée n'est pas identifiable, car deux peptides ayant une séquence d'acides aminés très différente peuvent en provoquer une (119). Cette méthode d'analyse sous-estimerait le potentiel de réactions croisées pouvant être fait dans le répertoire de cellules T de l'humain. Le potentiel de réactions croisées devrait plutôt être prédit par des analyses de similarité biochimique. Un TCR serait en mesure de reconnaître entre 0.1 et 1 millions de complexes peptide-CMH différents (89). Les CDR du TCR ont parfois un rôle à jouer dans ce phénomène en changeant de conformation pour s'ajuster aux différents antigènes, mais leurs interventions ne sont toutefois pas toujours nécessaires (118).

Des analyses sur des clones de cellules T ont démontré que 21% d'entre eux avaient des réactions croisées avec des peptides d'autres microbes dont ceux résidant dans le tractus intestinal humain (84). Les populations de cellules T ayant des réactions croisées sont spécifiques à l'individu, car chaque personne a un historique d'exposition aux organismes microbiens différent. Dans un même ordre d'idée, les cellules montrant de la réaction croisée après une vaccination vont aussi être propres à chaque individu (84). Les différences dans les réactions croisées observées chez les individus pourraient être une autre théorie pour expliquer l'hétérogénéité qui est observée lors de la réponse à l'infection par le VIH-1 ou au vaccin (86).

L'affinité du TCR pour son antigène influence également la probabilité que la cellule T CD4 effectue une réaction croisée. Les cellules ayant un TCR de faible affinité sont plus sensibles à des mutations se retrouvant dans les résidus d'ancrage du peptide au CMH (85).

Ces cellules sont donc moins propices à des réactions croisées. Les points de contact entre le TCR et le complexe peptide-CMH deviennent aussi plus importants lorsque l'affinité du TCR est faible. Le TCR aura besoin de la majorité de ces points de contact jugés importants pour reconnaître le peptide. Cela permet qu'il y ait moins de mutation dans le peptide sans affecter la reconnaissance. Ce type de cellules fera donc moins de réactions croisées (120). Le noyau nonamère des peptides qui se lie à la même molécule de CMH de classe II n'a besoin de partager que 5 acides aminés (position 2, 3, 5, 7 et 8) pour provoquer une réaction croisée sur un même TCR (85). Cela veut dire qu'en théorie on pourrait changer à notre guise les 4 autres résidus du nonamère sans affecter la reconnaissance par le TCR, ce qui correspond à presque 50% des résidus ayant un rôle dans la présentation de l'antigène. Quelques TCRs auraient également tendance à faire plus de réactions croisées que les autres, car ils interagissent davantage avec la molécule du CMH qu'avec le peptide lui-même (89).

Un autre facteur influençant les réactions croisées est l'expression de peptides du soi. L'expression systémique d'un peptide du soi crée plus de délétion clonale lors de la sélection négative dans le thymus. Cela réduit la population de cellules naïves spécifiques à un antigène pouvant provoquer une réaction croisée (85).

Les réactions croisées peuvent également se produire chez les anticorps. Le groupe du chercheur Haynes ont identifié une séquence d'acide aminé (LRAI) reconnue par un anticorps dirigé contre la protéine Gp41 (hélice heptad repeat HR-1 et HR-2) du VIH-1, mais qui est également présente chez l'ARN polymérase d'*E. coli* (sous-unité alpha) (107).



Avoir des cellules pouvant produire des réactions croisées procure un avantage pour l'élimination des agents pathogènes en mettant plus de pression sur les mutants viraux émergents (120).

Il y a beaucoup de variations au niveau de la spécificité et de la fréquence des cellules préexistantes spécifiques à des antigènes du VIH-1 chez les donneurs séronégatifs (119). Ces cellules pourraient bien avoir un rôle à jouer dans la variation des réponses immunitaires adaptatives qui est observée lors d'une infection par le VIH ou une vaccination. Parmi ces cellules, des cellules de type mémoires ont été identifiées (86). Elles montrent toutes les fonctionnalités d'une cellule mémoire: elles présentent les marqueurs de surface typique des cellules mémoires, elles produisent des cytokines rapidement et elles montrent une expansion clonale. Le ou les agents immunogènes qui ont pu « primer » les cellules T CD4 mémoires préexistantes ne sont pas bien connus encore (119). Ce phénotype mémoire est développé quelque part entre la naissance et l'âge adulte, puisqu'à la naissance, le compartiment de cellules T contient presque exclusivement des cellules naïves. Les cellules mémoires spécifiques au VIH chez les donneurs séronégatifs auraient développé leur phénotype mémoire par des signaux homéostatiques provenant soit d'interactions avec un complexe CMH-peptide du soi, soit de réactions croisées (86).

Une recherche de séquences homologues aux épitopes du VIH-1 reconnus par les cellules de donneur VIH négatif a démontré que 83% de ces épitopes étaient également retrouvés dans des protéines du microbiome humain. 70% des épitopes reconnus par les donneurs séronégatifs font partie des épitopes répertoriés dans la banque de données de Los Alamos National Laboratory (LANL) chez les individus séropositifs (119). Les réponses

générées contre des épitopes du VIH-1 reconnus par les donneurs séronégatifs peuvent également provenir de cellules créées lors d'une infection par un autre agent pathogène (121).

### **3. Les vaccins contre le VIH**

#### **3.1 Les types de vaccin**

Selon de nombreux experts, la solution pour mettre fin à l'épidémie du VIH-1 passe par le développement d'un vaccin efficace contre le VIH-1 (4). Il existe plusieurs types de vaccin. L'un d'eux est un vaccin contenant une ou des protéine(s) recombinante(s). Ce vaccin est utilisé dans le but de générer des anticorps neutralisants (122). Il y a aussi les vaccins à vecteurs viraux qui sont utilisés afin d'exprimer un antigène viral de façon intracellulaire. Cela a pour but de favoriser l'immunité cellulaire. Deux vecteurs sont couramment utilisés : l'adénovirus et le poxvirus (122). L'adénovirus permet l'infection de cellules se divisant ou non. Avec l'expression d'un grand nombre de transgènes il induit une réponse immunitaire robuste. L'immunité dirigée contre le vecteur peut parfois être un problème, puisqu'une grande partie des gens sont séropositifs pour ce virus. De son côté, le vecteur poxvirus est avantageux, car il reste stable lorsqu'il est lyophilisé. Il peut aussi contenir un insert d'ADN de grande taille sans perdre son caractère infectieux.

On peut également utiliser un vecteur viral nu, que l'on appelle un vaccin à ADN. C'est un plasmide qui a été désigné pour produire une ou des protéine(s) par les cellules de la personne vaccinée (122). Cette méthode est avantageuse car les antigènes sont faciles à désigner. C'est aussi un vaccin très stable et sécuritaire et il ne présente pas de réponse immunitaire dirigée contre le vecteur. Cependant, ce type de vaccin peut parfois se montrer moins efficace si le plasmide n'est pas bien incorporé dans les cellules.

Il est également possible de combiner deux types de vaccin pour augmenter l'efficacité. Le deuxième vaccin administré est appelé boost. Le boost est souvent fait d'une protéine recombinante ou d'un virus recombinant. La protéine recombinante permet d'augmenter la production d'anticorps neutralisants, leur avidité et leur persistance, alors que le virus recombinant permet d'augmenter la réponse cytolytique.

### **3.2 Les stratégies utilisées**

Plus de 30 vaccins candidats ont été testés lors d'essais cliniques, seuls ou en combinaison. Le but ultime est de créer un vaccin procurant une immunité à long terme contre le VIH-1. Pour ce faire, le vaccin devra créer une coordination entre les réponses des cellules B et des cellules T CD4 et CD8 (4). Parmi les stratégies utilisées pour y arriver, il y a entre autres des vaccins à ADN avec des vecteurs viraux de type adénovirus, alphavirus ou poxvirus, des vaccins à particules pseudo-virales et des vaccins contenant des protéines recombinantes solubles. L'antigène le plus souvent utilisé est celui de l'enveloppe (Gp120, Gp140 ou Gp160), mais certains vaccins ont également inclus les gènes codant pour Gag, Nef et Pol. Différents clades ont été utilisés. Le clade B est le plus utilisé puisque c'est celui qui est majoritairement présent en Amérique du Nord. D'autres clades ont été testés, notamment le A, le C et le E. Une stratégie pour créer un vaccin contre le VIH serait d'activer les cellules T à réactions croisées qui reconnaissent les régions conservées du VIH (120). Cela pourrait procurer une réponse contre l'agent infectieux, mais aussi contre les mutants.

Les premiers vaccins contre le VIH-1 ont été développés vers la fin des années 1980. Ils contenaient des protéines recombinantes de l'enveloppe du VIH-1. Bien que ces vaccins aient démontré l'induction d'anticorps neutralisants, malheureusement aucuns n'a démontré

d'efficacité contre l'infection puisque les anticorps étaient dirigés seulement contre la souche utilisée pour le vaccin (123). Cette réponse neutralisante limitée est dû à l'auto-réactivité des cellules B précurseurs développant les anticorps neutralisants ainsi qu'à leurs délétions.

À la suite de ces essais infructueux, l'emphase a été mise sur la génération d'un vaccin induisant une réponse cytolytique contre le VIH-1. La stratégie pour y parvenir consistait à insérer des gènes du VIH-1 dans un vecteur viral recombinant afin que les protéines résultantes soient présentées par les molécules du CMH de classe I (123). Le premier vecteur utilisé est l'adénovirus (rAd5). Il contient les gènes codant pour *gag*, *pol* et *nef* du clade B, mais il ne peut pas se répliquer. Le niveau de réponse lymphocytaire T CD8 dirigée contre les clades B et C du VIH-1 générée par ce vaccin était acceptable. Cependant, aucun effet sur la charge virale et sur l'acquisition du VIH-1 n'a été observé, puisque les réponses des cellules T CD8 étaient dirigées contre des régions variables du virus (123). L'absence de la composante de l'enveloppe, générant habituellement les anticorps, pourrait expliquer une partie de l'inefficacité du vaccin (122).

Par la suite, un vaccin à ADN a été testé avec un boost rAd5 (DNA prime-rAd5 boost). Il contient les gènes *gag*, *pol* et *nef* du clade B du VIH-1 et un mélange des clades A, B et C du gène *env gp140* réparti dans 6 plasmides. Les anticorps qui ont été produits n'étaient pas neutralisants et étaient dirigés en majorité contre gp41 (122). Les anticorps générés montrent une réaction croisée avec le microbiote intestinal, soit avec la polymérase ARN bactérienne *E.coli* et la pyruvate-flavodoxin oxidoréductase qui partagent des séquences similaires avec la région HR-1 de gp41 (107, 123). Malheureusement, le vaccin n'a pas démontré d'efficacité à long terme.

D'autres essais de vaccins ont été effectués avec un vecteur canarypox (ALVAC-HIV vCP1521) contenant la protéine gp120 ou gp160 du VIH-1 clade B. Ces essais n'ont pas été très concluants. Une réponse humorale et cellulaire sont induites, mais les réponses CD8 dans des essais Elispot sont faibles (124). De plus, des anticorps neutralisants ne sont pas toujours détectés. Toutefois, chez les primates non-humains, le vaccin ALVAC-SIV, administré de façon néonatale, protège contre une exposition à une faible dose du virus VIS, mais il n'est pas efficace contre une exposition plus intense. Il permet cependant de réduire la charge virale et de ralentir la progression de la maladie.

Un vaccin bivalent contenant la protéine de l'enveloppe du VIH-1 des sous-types B et E a été injecté à des utilisateurs de drogue (AIDSVAX B/E). Malheureusement, le vaccin n'a démontré aucun effet sur l'acquisition du VIH-1 (122, 124).

L'étude RV144 a, quant à elle, combiné un boost AIDSVAX B/E à un vaccin à ADN ayant un vecteur canarypox contenant les gènes *gag* du sous-type B du VIH-1 et l'enveloppe du sous-type E du VIH-1 (124). Même si les anticorps développés par ce vaccin ne sont pas neutralisants (122), ils ont permis d'identifier un acide aminé jouant un rôle important. La grande majorité des anticorps générés lient un épitope contenant une lysine en position 169 retrouvé dans la région V2 de Gp120 (123). Cette étude est la première à montrer un potentiel pour prévenir l'infection par le VIH (4), mais sa modeste efficacité diminue avec le temps (60,5% après une année et 31,2% après trois ans et demi (123)). Cette diminution est probablement due à une pression immune de la part des anticorps spécifiques à la lysine 169. De plus, son efficacité semble meilleure chez les personnes à faible risque d'infection (124). Cependant, il s'agit du seul vaccin candidat contre le VIH ayant montré une protection significative dans une étude randomisée prospective. L'étude a aussi démontré qu'un vecteur

de la famille des poxvirus devait être considéré comme un sérieux candidat dans l'élaboration du vaccin contre le VIH-1(4).

Le vaccin MVA-B (Modified Vaccinia Virus Ankara) est un vaccin à ADN ayant un vecteur poxvirus. Ce vecteur est reconnu pour ses records de sécurité. Malgré son pouvoir de réplication limité chez l'humain, il est capable d'obtenir un taux élevé d'expression génétique et de déclencher de fortes réponses immunitaires (4). Ce vaccin code pour les antigènes Env, Gag, Pol et Nef provenant du clade B du VIH-1. Il induit de nouvelles réponses T spécifiques au VIH qui sont polyfonctionnelles pour 25% des cellules T CD4 et 45% des cellules T CD8. Il induit également des réponses de longue durée en engendrant des cellules T CD4 mémoires centrales (TCM) et des cellules T mémoires effectrices (TEM) ainsi que des cellules T CD8 mémoires effectrices RA (TEMRA) et TEM (4, 125). Tout au long de l'essai, les participants ont démontré une réponse positive pour la production d'IFN- $\gamma$  provenant des cellules T spécifiques au VIH-1 (4). Une réponse humorale est aussi observée chez la plupart des vaccinés. Après la troisième dose, 72,7% des vaccinés avaient un taux détectable d'anticorps dirigés contre Env. La protection de ce vaccin s'est élevée jusqu'à un an pour 85% des participants (4). Cependant, aucune information n'est disponible concernant les années qui suivent.

Certains chercheurs explorent l'utilisation d'adjuvants en combinaison au vaccin. Les anticorps bloquants contre PD-1 sont entre autre analysés comme adjuvant. Leur utilisation chez des macaques infectés chroniquement par le VIS a déjà démontré une amélioration des réponses cytolytiques spécifique au VIS. Par la suite, la vaccination de macaques non-infectés par le VIS en combinaison avec des anticorps bloquants contre PD-1 a aussi démontré de meilleures réponses cytolytiques (67).

Certains vaccins ont été testés comme vaccin thérapeutique dans l'espoir de réduire le réservoir viral. Certains chercheurs se disent que si l'on ne peut pas faire un vaccin protégeant contre l'infection, on pouvait s'en servir pour réduire au minimum la charge virale et ainsi réduire la transmission (58). Le MVA-B est l'un de ces vaccins. Chez des volontaires VIH positifs, 3 doses de vaccination augmentent les réponses T spécifiques à Gag, ainsi que la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4 (125). 40% des cellules T CD4 montrent au moins 2 fonctions effectrices (production d'IFN- $\gamma$ , IL-2 ou TNF- $\alpha$ ), mais celles-ci n'ont aucun impact sur le réservoir viral. De leur côté, les réponses T CD8 n'ont pas démontré de variation à la suite de l'administration des vaccins. De plus, le délai entre l'arrêt de la trithérapie et l'augmentation de la charge virale après 3 doses du vaccin MVA-B n'est que modeste.

Le vaccin thérapeutique Tat a eu plus de succès. Les anticorps anti-Tat sont assez rares lors d'une infection par le VIH-1. Lorsqu'ils sont présents, ils sont associés à une phase asymptomatique et à une progression lente de la maladie. L'étude a été menée chez des participants sous trithérapie. Elle a démontré une restauration du nombre de cellules T CD4, T CD8 et T centrales mémoires, ainsi que du nombre de cellules B et NK (123). Une réduction de l'état d'activation du système immunitaire et une réduction de la charge virale sont également observées, et ce, jusqu'à 3 années post-vaccination.

Étant donné les défis spécifiques posés par le VIH, beaucoup d'efforts sont actuellement centrés sur une approche rationnelle de développement vaccinal, combinant en particulier biologie structurale et moléculaire avec des modèles d'immunisation *in vivo* comme les macaques ou de petits animaux exprimant un répertoire d'anticorps humains (126).

### **3.3 Les problématiques générales**

Les problématiques majeures rencontrées par les chercheurs travaillant sur le développement d'un vaccin contre le VIH sont l'absence d'anticorps neutralisants à large spectre capable de bloquer des souches hétérologues créés par les vaccins candidats et l'absence de protection à long terme. Ceci est en grande partie causé par les propriétés structurales du trimère de l'enveloppe. Le VIH est un virus possédant un haut degré de variabilité antigénique, ce qui présente un autre obstacles important dans le développement d'un vaccin efficace (90), puisque les anticorps neutralisants générés sont hautement spécifiques pour une souche virale donnée (126).

La protéine de l'enveloppe étant l'unique cible des anticorps neutralisants, des efforts afin de construire un trimère stable devront être déployés, puisque l'instabilité des trimères existants induit des anticorps non-neutralisants. Plusieurs stratégies pour y arriver sont en cours d'études (126). Certains explorent la co-cristallisation de trimères d'enveloppe recombinant avec des anticorps neutralisants à large spectre dans le but de générer une structure haute résolution permettant de stabiliser le trimère. D'autres veulent utiliser la cryo-microscopie électronique et la cryo-tomographie électronique pour découvrir de nouveaux détails moléculaires pouvant résulter en la fabrication d'un trimère stable. Lorsqu'un trimère stable pourra être généré, il faudra aussi penser à une stratégie pour affaiblir les réponses immunitaires dirigées contre les régions immunodominantes variables de l'enveloppe pour favoriser la production d'anticorps neutralisants à large spectre. La génération de nouveaux anticorps neutralisants dans les 2 dernières années commence à permettre l'identification de nouveaux sites vulnérables sur la protéine de l'enveloppe du VIH (63). Le grand défi qui suivra ensuite sera de convertir ces épitopes protectifs en antigènes protectifs destinés à



produire un vaccin engendrant des réponses de la part des cellules T CD4 auxiliaires. Une approche possible pourrait être l'utilisation d'un vecteur exprimant des molécules ressemblant à des anticorps bloquants.

Il importe également de connaître la forme sous laquelle la protéine de l'enveloppe du VIH est majoritairement présentée aux cellules B. Elle peut soit être sous une forme monomérique gp120 ou gp41, soit se retrouver en fragment, soit être sous sa forme non-clivée gp160. Cette information est importante pour le design d'un vaccin puisqu'il faut prévoir comment la protéine sera procédée et présentée aux cellules B. Ces cellules B productrices d'anticorps vont recevoir de l'aide de la part des cellules T folliculaires auxiliaires (Tfh), un sous-groupe distinct de cellules T CD4, pour former et maintenir les centres germinatifs. Il y a présentement une augmentation de l'intérêt pour l'étude de ces cellules qui jouent un rôle majeur dans le développement d'anticorps neutralisants. L'identification et le suivi de ce type de cellules spécifiques au VIH vont nous permettre de mieux comprendre leur rôle dans le développement d'anticorps chez les humains infectés par le VIH ou par les vaccins candidats (126).

Il est commun d'utiliser un vecteur viral comme celui de l'adénovirus pour procurer une immunité contre des protéines produites par un autre virus. Les réponses produites par ce type de vaccin peuvent être fortes. Cependant, elles peuvent provenir en majorité de la réactivation des cellules T CD4 spécifiques au vecteur viral. Cette réactivation pourrait avoir comme effet l'induction de cellules T CD8 de plus faible affinité pour l'antigène ciblé par le vaccin (89). Pour contrer ce problème, l'utilisation de vaccins atténués serait préférable, mais dans le cas du VIH, le risque de provoquer une infection est beaucoup trop grand. Les vecteurs viraux pourraient par contre être adaptés afin de ne pas contenir les épitopes causant de

l'interférence avec ceux de la protéine cible. De nouvelles recherches utilisant un vecteur CMV simien, dans le but de délivrer continuellement des antigènes du SIV, ont été en mesure de limiter l'infection systémique chez quelques animaux (63). Étant administré de façon sous-cutané, ce vaccin a démontré l'induction de réponses protectrices dans les muqueuses. Cela démontre qu'il est bien possible de créer une résistance contre l'infection d'un lentivirus par l'exposition de ses antigènes.

Plusieurs thérapies immunes spécifiques au VIH ont été tentées : une immunothérapie à base d'anticorps neutralisants, des vecteurs à ADN, des vecteurs viraux ou des vaccins à base de cellules dendritiques. Aucune de ces thérapies n'a été capable de contrôler l'infection par le VIH à long terme (125). Cependant, une de ces thérapies pourrait peut-être avoir un effet bénéfique si elle est combinée à un vaccin, comme l'administration des antigènes par des cellules dendritiques. Cette méthode d'administration permettrait de contourner les mécanismes d'épuisement cellulaire (63). Ces mécanismes affectent grandement les réponses vaccinales. L'étude du sujet devra être approfondie afin de créer un vaccin capable de les manipuler.

Une autre solution qu'il serait possible d'explorer est l'immunisation néonatale avec l'enveloppe du VIH-1. Puisque le répertoire des cellules B est généré à la naissance par les microorganismes intestinaux, peut-être que cette immunisation pourrait faire en sorte de générer des cellules B répondant aux antigènes de l'enveloppe non-dominant. Certains suggèrent aussi de délaisser ou de modifier une région de gp41 dans les vaccins pour éviter les réactions croisées entre les acides aminés de la région HR-1 et les microorganismes de l'intestin (107).

Il reste encore plusieurs connaissances à acquérir sur le sujet afin de développer un vaccin efficace contre le VIH. La base des mécanismes immunologiques capables de prévenir la propagation systémique du foyer de l'infection devra être mieux comprise. Il faudra entre autres déterminer la nature de la réponse immunitaire nécessaire pour procurer une protection contre le VIH, ce qui comprend la qualité et la quantité de réponses immunitaires devant être induites et l'antigène idéal devant être inclus dans le vaccin. Une meilleure compréhension des relations entre les réponses immunitaires innées et adaptatives face aux antigènes du VIH devra être explorée, car contrairement à d'autres agents pathogènes, une protection contre le VIH ne peut pas être acquise avec seulement une réponse humorale ou cytolytique. D'ailleurs, plusieurs règles de base de l'immunologie indiquent qu'un vaccin stable de longue durée contre le VIH ne pourra pas être généré sans l'induction de réponses protectrices de la part des cellules T CD4. Les stratégies vaccinales ne sont pas beaucoup exploitées jusqu'à présent, mais elles devraient figurer parmi les priorités pour le futur. Pour terminer, le vaccin contre le VIH devra être capable de prévenir l'établissement de la phase latente du virus, car durant cette phase, aucun antigène n'est exprimé et cela serait une des causes de l'inefficacité des vaccins contre le VIH (63).

## Hypothèses

Nous postulons que des lymphocytes T CD4 spécifiques au VIH-1 fonctionnelles existent chez une minorité substantielle de donneurs séronégatifs. Nous présumons que ces réponses sont générées en réaction à d'autres agents pathogènes, présentant une réactivité croisée avec les protéines du VIH, mais présentant aussi des différences fonctionnelles significatives avec celles de patients infectés.

Nous croyons également que les peptides immunodominants chez les donneurs VIH négatifs auront des similarités mais aussi des différences avec ceux retrouvés chez les donneurs VIH positifs. Les donneurs VIH négatifs possèdent des cellules spécifiques capables de reconnaître certains épitopes d'antigènes du VIH, mais cela se ferait par des réactions croisées avec des antigènes rencontrés antérieurement par le système immunitaire. Les donneurs VIH positifs ont, de leur côté, été en contact avec le virus et donc ce ne seront pas nécessairement les mêmes peptides qui seront dominants.

## Objectifs

Investiguer la capacité des cellules T CD4+ provenant de donneurs VIH négatifs à proliférer lors de la rencontre d'ensemble de peptides représentant les antigènes Gag, Env, Nef et Pol du VIH.

Confirmer la spécificité des réponses prolifératives spécifiques au VIH en générant *in vitro* des lignées de cellules T CD4+ spécifiques au VIH dérivant de donneur VIH séronégatifs.

Définir les fonctions des cellules T CD4+ spécifique au VIH en les comparants à des lignées générées à partir de donneurs VIH positifs.

Déterminer les épitopes du VIH reconnus par les cellules T CD4 et comparer le profil d'immunodominance avec les données recueillies à l'aide du même protocole pour des donneurs VIH positifs.

**Article:**

**Prevalence, Specificity and Function of pre-existing HIV-specific CD4 T cell  
responses in uninfected donors**

Audrey DAIGNEAULT<sup>1,2</sup>, Nathalie BRASSARD<sup>1</sup>, Lucie BARBLU<sup>1</sup>, Roxanne CHARLEBOIS<sup>1</sup>, Amy E. BAXTER<sup>1,2,3</sup>, Jean-Pierre ROUTY<sup>4</sup>, Daniel E. KAUFMANN<sup>1,3,5,6</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>3</sup>Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology and Immunogen Discovery (CHAVI-ID), La Jolla, CA 92037, USA.

<sup>4</sup>Département de médecine, Division d'hématologie, Institut de recherche du centre de santé de l'Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

<sup>5</sup>Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

<sup>6</sup>Ragon Institute of MGH, MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA

**Article pour soumission dans le journal :** Journal of Virology

**Contribution des co-auteurs :**

Les échantillons ont été obtenus avec l'aide de l'équipe du Dr Jean-Pierre Routy et de son infirmière Josée Girouard qui effectue les leukaphérèses. L'étude a été mise en place par Daniel Kaufmann. Nathalie Brassard et Roxanne Charlebois ont effectué certaines expériences. Lucie Barblu et Amy Baxter ont fourni des idées pour le plan de l'étude. Audrey Daigneault a réalisé la majeure partie des expériences. Daniel Kaufmann est le chercheur principal du projet. L'article a été rédigé par Audrey Daigneault et Daniel Kaufmann.

**Prevalence, Specificity and Function of pre-existing HIV-specific CD4 T cell  
responses in uninfected donors**

**Authors :** Audrey Daigneault<sup>1,2</sup>, Nathalie Brassard<sup>1</sup>, Amy E. Baxter<sup>1,2,3</sup>, Lucie Barblu<sup>1</sup>,  
Roxanne Charlebois<sup>1</sup>, Jean-Pierre Routy<sup>4</sup> and Daniel E. Kaufmann<sup>1,3,5,6</sup>

**Affiliations :**

<sup>1</sup> Research Centre of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>3</sup> Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology and Immunogen Discovery (CHAVI-ID), La Jolla, CA 92037, USA.

<sup>4</sup> Chronic Viral Illnesses Service and Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>5</sup> Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3T5, Canada

<sup>6</sup>Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA

**Correspondence:** [daniel.kaufmann@umontreal.ca](mailto:daniel.kaufmann@umontreal.ca) or [dkaufmann@mgm.harvard.edu](mailto:dkaufmann@mgm.harvard.edu)

**Running title:**

HIV-specific CD4 T cells in uninfected individuals

**Word count:** Abstract: 250, Text (excluding abstract): 5 765



## **ABSTRACT**

+ T cell (Thelper, TH) responses play a key role in antiviral immunity. However, HIV-specific TH responses generated either by infection or by vaccine candidates are highly variable. Studies in mice and humans suggest that antiviral TH responses can be generated before exposure to the specific viral pathogen through cross-reactivity with other microorganisms. These pre-existing responses may influence development of TH responses upon pathogen or immunogen exposure. We investigated HIV-specific TH responses in HIV-uninfected individuals (UD) and compared them to those of HIV-infected donors (HI). The prevalence of HIV-specific proliferative TH responses in UD was surprisingly high: 33% of UD had a robust Gag response >1% by CFSE assay. While Gag was more frequently targeted than the alternative HIV proteins Env, Nef and Pol, we did not observe the strong Gag immunodominance pattern seen in HI. Proliferative responses were overall lower in UD than HI, but strong expansion was occasionally observed. We derived Gag- and Env-specific short-term TH cell lines from UD and used intracellular staining to confirm their specificity and functions. TNF- $\alpha$  and CD40L dominated TH responses in UD lines, contrasting with HI lines that were robust IFN- $\gamma$  producers. Functional affinity in UD was variable and could be improved in some subjects by optimization of antigen presentation. Gp41 epitope mapping identified peptides recognized by TH from UD. The results show that functional HIV-specific CD4 T cells exist in a substantial proportion of UD. Such pre-existing CD4 T cells could impact development of virus-specific TH responses at the time of acute HIV infection and influence responses to vaccine candidates.

**Key words:** HIV, CD4 Thelper cells, cross-reactive responses, gp41, epitope mapping, pre-immune repertoire

## INTRODUCTION

HIV causes a loss of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and a chronic immune activation that, if untreated, lead to the development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in the large majority of infected individuals (1, 2). HIV-specific CD4 T cells recognize specific viral epitopes presented by HLA Class II in order to establish an immune response in the context of an infection or a vaccine. The magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses mounted against HIV antigens is highly variable between infected individuals (3-5), while the CD4 T cell responses induced by candidate HIV vaccines in healthy volunteers also demonstrate significant variation. For example, the RISVAC02 study demonstrated Env-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in 23% of the vaccinated individuals, two weeks after the final immunization, as measured by intra-cellular cytokine staining (ICS) for IFN- $\gamma$  protein production following stimulation with the immunogen(6). Similarly, the RV144 trial reported positive anti-Env responses in an IFN- $\gamma$  ELISPOT assay for 41% of vaccine recipients, also at 2 weeks post the final dose (7). This variability is observed between individuals receiving the same immunogen. The factors that determine these variations at a population level remain largely unknown.

Studies utilising murine models of viral infection have previously indicated that the plasticity of antigen recognition by memory CD8<sup>+</sup> T cells is influenced by the history of pathogen exposure, a finding that has also been observed in humans (8). Therefore, memory T cells generated as a consequence of one infection can influence protective immunity and immunopathology associated with a second, unrelated, virus. As a consequence, a multitude of viruses encountered throughout the lifespan of an individual

constantly transform our T cell repertoire and influence the induction of CD8 T cell responses to future viral infections. This heterologous immunity is not as effective at clearing the pathogen as homologous immunity (i.e. memory generated from multiple encounters with the same pathogen), but when a cross-reactive process is implicated the memory responses can be long-live. More recently, this concept of T cell-dependent heterologous immunity and immunopathology (9) has been extended to CD4 T cell responses in humans (10).

A pMemory CD4+ T cells specific to the immunodominant epitopes of different viruses, including HIV, have been detected in non-infected adults; some of these virus-specific CD4 T cells recognized epitopes with a strong protein sequence similarity to epitopes from common human commensal bacteria (11, 12). These data suggest that this pre-existing CD4+ T cell memory repertoire is, at least in part, shaped by the physiological microbiome and that such pre-existing cross-reactive responses can contribute to immunodominance patterns in T cell responses observed upon subsequent HIV infection.

Another report showed that many epitopes recognized by these pre-existing HIV-specific CD4 T cells share an amino acid sequence with proteins of the human microbiota (12), with up to 83% of HIV-1 epitopes recognised by memory CD4 T cells of non-infected donors matching epitopes of human microbiome proteins. This suggests that cross-reactivity may play an important role in the generation of virus-specific CD4 T cell

responses by priming T cells against other antigens. Class II tetramers have been used successfully to identify such pre-existing antigen-specific T cells with high sensitivity and specificity (11). In another approach, a protocol using maximal stimulation by a combination of PHA, heterologous feeders and high-dose IL-2 was successfully used to probe both the naive and memory CD4 T cell repertoires recognition HIV epitopes (12). While powerful, such tools are limited in their ability to assess the functionality of these cross-reactive responses. For example, the capacity of such CD4 T cells to respond to physiologic TCR signaling i.e. signaling triggered by recognition of epitopes bound to HLA Class II presented on antigen-presenting cells (APC) remains unclear. Furthermore, the ability of these pre-existing responses to provide CD4 T cell help through the upregulation/expression of co-signaling molecules is unknown. These pre-existing cells can also have a link with the elite controller status of some HIV infected patients. Around 1% of HIV infected persons have the ability to control their viremia under the detectable limits (<50 copies/ml) without any treatment. The mechanisms that allow to these persons to control their viremia are not known yet. There is only some links that was made with specific HLA alleles, like the HLA-B57 and HLA-B27, which are frequently seen in elite controllers (13).

In this study, we investigate the prevalence, specificity and function of HIV-specific CD4 T cells in HIV seronegative adults. We show that functionally competent memory CD4 T cells able to rapidly expand upon encounter with cognate cross-reactive HIV antigens are present in a substantial proportion of HIV-seronegative donors. Furthermore, we describe both similarities and differences in their functional

characteristics when compared to responses identified in patients chronically infected with HIV.

## RESULTS

### **Functional virus-specific CD4 T cells endowed with proliferative capacity are frequent in HIV uninfected donors**

In order to establish the prevalence of HIV-specific CD4 T cell responses in the absence of infection, we first screened a cohorts of HIV seronegative (UD, n=18) for CD4 T cell proliferative responses to HIV antigens and compared these responses to those observed in chronically HIV-infected donors (HI, n=53). Baseline patient characteristics are summarized in [Tables 1 and 2](#). Of note, two of the UD were identified as partners in HIV-discordant couples, engaging in unprotected sexual intercourse, and therefore are considered to be at high risk of HIV exposure. As pre-existing, cross-reactive CD4 T cell responses were likely to be present at low frequencies, we reasoned that CFSE-based proliferation assays would be a sensitive tool to detect them, allowing antigen-specific cells to expand during a seven-day culture. As CD8 T cells can inhibit CD4 T cell proliferation through consumption of IL-2, therefore decreasing the amount available *in vitro*, and by expressing inhibitory molecules, we first depleted CD8 T cells from PBMCs, as previously described (14, 15). CD8-depleted PBMCs were then stained with the cell tracker CFSE and stimulated with pools of overlapping peptides corresponding to the HIV protein products of the Gag, Env, Nef and Pol genes. Cells stimulated or not with phytohaemagglutinin-M (PHA) were used as negative and positive controls respectively. Proliferative responses were quantified after 7 days as the proportion of CFSE<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells ([Figure 1](#)). The gating strategy is demonstrated in [FigureS1A](#). As illustrated in the representative flow cytometry plots in [Figure 1A](#), CD4<sup>+</sup> T cells proliferated in response to HIV antigens in a subset of UD. 6/18 UD showed a

proliferative response at least twice background for at least one of the antigens tested (Table 3). The strength of such responses varied between both antigen and patient studied; while responses in UD2 predominantly recognized Gag and Pol, mirroring the dominance of these two proteins in HI patients (see example, [Figure S2A](#)), UD3 showed robust responses to the Env and Nef peptide pools. Analysis at the cohort level ([Figure 1B and Table 1](#)) confirmed the lack of clear hierarchy amongst the protein targeted in UD with similar median net responses to Gag, Env and Pol (0.41%, 0.39% and 0.41% respectively), while the responses against Nef were smaller (0.03%). These results contrasted with the findings in HI subjects ([Figure 1C](#)), in whom proliferative responses to Gag were strongly immunodominant (median = 3.0%), good responses to Pol were also frequently detected (median = 1.5%), and responses to Env and Nef usually weaker (median = 0.3 and 0.06% respectively). Direct comparison between UD and HI cohorts illustrated, that responses in UD were overall of smaller magnitude than in HI ([Figure 1D](#)). However, several UD presented robust responses to HIV antigens ([Table 1](#)). Intriguingly, stratification of HI according to viral control status illustrated differences amongst groups ([Figure S2B, C, D](#)); while viral control restored some proliferative responses in ART-treated subjects compared to untreated individuals, several elite controllers stood out as having robust proliferative responses targeting multiple HIV proteins. This shows that under certain circumstances the immune system is also able to mount robust HIV-specific TH responses in response to infection. Of particular interest with regards to vaccine development, we were able to detect robust responses to Env in both the ART-treated and elite controller groups, although such responses were more rare and lower in magnitude than those raised against alternative HIV antigens.



In order to focus on those UD who mounted a strong proliferative response to the HIV-antigens, we defined robust proliferative CD4 T cell responses as those being more than twice the background proliferation in the unstimulated condition and having a net value greater than 1% after background subtraction. Using these criteria, we observed that robust proliferative responses were most prevalent against Gag (occurring in 33% of UD compared to 68% in HI) (Figure 1E) and less common for alternative HIV antigens, as seen for the total proliferative responses. However, consistent with the results of Figure 1B, Gag was again not as immunodominant in UD as in HI individuals: robust proliferative CD4 T cell responses to other HIV antigens were present in 17% (Env), 22% (Nef) and 28% (Pol) of the UD examined. Importantly, the two patients at high risk of HIV exposure did not possess robust proliferative responses.

Given previous results on heterologous viral immunity in murine models (8, 9) and recent data suggesting that CMV seropositivity is associated with better responses to influenza vaccination in humans (16), we next investigated whether there was an association between HIV-specific CD4 T cell responses in UD and the subject's CMV status. Overall, the pattern of HIV-specific responses were quite similar in CMV seropositive (CMV+) and CMV seronegative (CMV-) UD, with no significant difference observed at the individual protein level or when all HIV antigens were pooled (Figure S2E, F, G). We looked at the CD4 T cell proliferation to the pp65 antigen and the whole CMV viral lysate. Accordingly, the HIV status of the donor did not have an impact on the magnitude of the CMV proliferative responses (Figure S2H, I, J). Intriguingly, although

we found that CMV-specific CD4 proliferative responses were prevalent and showed a higher magnitude of responses in CMV+ compared to CMV- subjects (Supplemental Figure 1HI), the occasional CMV- subjects presented proliferative responses to CMV antigens (Supplemental Figure 1J). Thus, our observations of cross-reactive CD4 T cell responses of Figure 1 do not appear unique to HIV.

Of note, intracellular staining for commonly assessed cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2), after a 6h stimulation, failed to identify HIV-specific CD4 T cells in UD subjects, whereas these assays readily determined such responses in infected individuals (data not shown). These results suggest that the populations of HIV cross-reactive CD4 T cells in UD are small and/or do not express effector cytokines readily detected in standard ICS assays, but that they can undergo a robust expansion when they are exposed to HIV antigens.

Taken together, these data demonstrate that a population of CD4 T cell able to expand upon exposure to HIV antigens can be identified in the peripheral blood of a proportion of UD. Furthermore, in contrast to observations made in HI donors, such responses do not show a clear immunodominance of Gag over Env or other HIV proteins.

**Short-term HIV-specific CD4 T cell lines derived from uninfected donors are functional and robustly express TNF and CD40L upon cognate antigen restimulation.**

To confirm the specificity and assess the functional profile of cross-reactive HIV-specific CD4 T cell responses, we generated short-term cell lines against HIV peptide pools for a subset of the UD. We focused on the Gag and Env HIV antigens. Gag was selected as it was frequently recognized in CFSE assays by UD and an immunodominant protein for CD4 T cells in the context of natural HIV infection (Figure S2A) and (3)). Env was investigated as follicular helper T cells targeting this protein may provide critical help for the development of broadly neutralizing antibodies (bNAbs), all bNAbs target Env, in the context of vaccination (17, 18). CD4 T cell lines generated against the pp65 matrix protein of CMV were used as controls.

We used standard protocols to growth CD4 T cell lines were established as previously described (3). After 10-12 days of *in vitro* expansion, the specificity of the cell lines were assessed by flow cytometric detection of intracellular TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD40L and IL-2 production following cognate antigen restimulation. A list of the cell lines generated and their basic characteristics is detailed in Table 3. Although for these experiments we preferentially selected donors that showed robust proliferative responses for the Gag or Env antigens (as shown in Table 1), we were also able to easily grow HIV-specific CD4 T cell lines from patients with weak CFSE responses. For example, we grew an Env-specific cell lines from UD1 and an Gag-specific CD4 T cell line from UD5, in whom where in all two cases the net CFSE proliferative response was <1%. As illustrated in the representative flow cytometry plots (Figure 2A) and confirmed in

summary data (Figure 2B), the cell line recall responses were dominated by the expression of CD40L and TNF- $\alpha$ , in UD. IL-2 responses were very low or undetectable due to the negative feedback caused by of an IL-2 supplemented culture medium. Interestingly, the fraction of IFN- $\gamma$  secreting cells was significantly lower in UD-derived HIV-specific CD4 T cell lines (Figure 2AB), contrasting with the typical pattern observed in HI subjects, in whom the production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are in the same range (Figure 2 CD). The gating strategy used to analyse the cytokine production is shown in Figure S1B. Therefore, HIV-specific CD4 T cell lines derived from UD and HI subjects appear to retain some functional differences, this in spite of the *in vitro* expansion.

### **HIV-specific CD4 T cell lines derived from uninfected donors present distinct polyfunctionality patterns**

To better understand the functionality of HIV-specific CD4 T cell lines generated from UD, we next examined the co-expression patterns of CD40L, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by such cell lines (Figure 3). As illustrated in the examples in Figure 3A and summarized across the cohort in Figure 3B the majority of Env gp41- and Gag-specific CD4 T cells within a cell line express CD40L and/or TNF- $\alpha$ . Consequently, a significant majority of HIV-specific CD4 T cells from UD were monofunctional by this assay (Figure 3C), a substantial fraction exerted two functions, and few exerted all three functions measured. In contrast, and as shown in the representative examples in Figure 3D, IFN- $\gamma$  was produced by a median of 46% of the HIV-specific cells from HI subjects-derived CD4 T

cell lines (Figure 3E) and mono-, dual- and triple-functional cells were found at similar frequencies in this cohort (Figure 3F).

We next sought to determine whether the patterns observed in Figure 3A-F were specific for HIV, or could be also observed for Thelper responses to other viruses. To address this question, we generated CMV pp65-specific CD4 T cell lines from two CMV+ and one CMV- UD donors (Figure 3G). The CD4 T cell cytokine secretion profile for the CMV+ donors was similar to the one observed in HIV-specific cell lines generated using HI donors PBMCs, with large proportions of IFN- $\gamma$ + and triple-functional antigen-specific CD4 T cells. Interestingly, the CMVpp65 cell line derived from the CMV- individual had a secretion profile identical to the HIV-specific CD4 T cells from UD cell lines, showing domination of CD40L and TNF- $\alpha$  responses with a low IFN- $\gamma$  response (Figure 3H). Profile of effector molecules in CMVpp65 CD4 cell lines generated from CMV+ HI patients was similar to those from UD illustrated in Figure 3G (data not shown).

These data demonstrate that virus-specific cross-reactive CD4 T cell lines derived from uninfected donors for both HIV and CMV present reduced polyfunctionality, as measured by a classical Th1-oriented ICS panel, when compared to responses in chronic infection.

**Functional affinity of HIV-specific responses in CD4 T cell lines derived from uninfected donors is variable and can be improved by enhanced antigen presentation.**

Having shown that the specificity and function of HIV-specific CD4 T cells in UD can be reliably assessed by ICS using a standard dose of 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ /peptide, we next sought to define whether the functional affinity of these responses in UD reached similar levels to those of HI subjects, or were of lower affinity and efficiently triggered only by higher antigen dose or optimal antigen presentation. We thus determined dose-response curves for TNF- $\alpha$ , CD40L and IFN- $\gamma$ , using gp41-specific cell lines derived from 2 UD and 1 HI, and 3-fold dilution of the HIV antigen (Figure 4ACE). As shown by comparing the EC50 (Figure 4BDF), the functional affinity for all three parameters measured was highest for the HIV-infected patient HI7 compared to UD1 and UD3. However, we observed a marked difference between the two UD: the EC50s determined for UD1 reached levels close to those determined for HI7, while EC50s for UD3 were markedly higher. We reasoned that the lower functional affinity of the UD3 cell line may have been caused by lower TCR affinity and exacerbated by the 12-day *in vitro* culture, in which a number of APC are expected to die and/or become dysfunctional. In order to test this hypothesis, we optimized antigen presentation to the CD4 cell lines by adding autologous Ag-pulsed monocytes at a 1:5 ratio immediately following their isolation from thawed autologous PBMC samples. As predicted by the TCR affinity hypothesis, the extra APCs led to increased net responses for the low-affinity UD3 line (Figure 4G), but had minimal impact on the UD1 line (Figure 4H) and a negative impact on the net responses of the

HI7 line, due to increased background observed in the NS condition ([Supplemental Figure 2](#)).

Of note, addition of monocytes as extra APCs had a greater effect than either isolated CD3-depleted PBMCs or B cells (data not shown). We also observed that addition of APC, while augmenting the responses in UD3, did not preferentially induce more IFN- $\gamma$  secretion.

Therefore, the functional affinities of UD-derived HIV-specific CD4 T cell lines are diverse but may be in a similar range to those observed in HI, and low affinity can be, at least in part, overcome by adding better APCs. This may suggest a stronger dependence of these low-affinity responses on co-signaling molecules or cytokines secreted by APCs.

### **Seronegative individuals share some immunodominant epitopes with infected people**

Having characterized the profile of HIV-specific CD4 T cells in uninfected donors, we next asked whether functional responses in UD targeted the same epitopes as in HIV-infected individuals. To identify the epitopes recognized by CD4 T cells from Env gp41-specific cell lines in HIV negative and positive subjects, we examined the responses induced after a 6h ICS stimulation with the individual peptides that constitute the gp41 peptide pool used to grow the cell line. These peptides consist of 15-mer overlapping by 11 amino acids mapping the entire gp41 protein. [Figure 5](#) shows the

peptides that gave positive responses following stimulation for the 3 donors tested (UD1, UD3 and HI7). 24 peptides elicited positive responses in at least in one of the three donors and are listed in Table 4, where they are also compared to the references sequences identified in the literature. Eleven peptides were recognized by the UD1 (13% of all gp41 peptides), 5 peptides by the UD3 (6%) and 15 by the HI7 donor (17%). The two immunodominant peptides, based on the magnitude of the responses, were the overlapping peptides 198 (LKYWWNLLQYWSQEL) and 199 (WNLLQYWSQELKNSA). The overlapping sequence is underlined. 198 elicited a positive response in 2/3 donors (UD3 and HI7) and 199 was recognised by all three donors. Interestingly, we were not able to identify any previously published reports identifying these sequences as CD4 T cell epitopes.

cross-reactivity with pre-existing responses contributes to Thelper immunodominance patterns in HIV infection.



## DISCUSSION

In conclusion, we have shown that a surprisingly high proportion of HIV-uninfected individuals have functional HIV-specific CD4 T cells in the peripheral blood. These responses can be readily identified by CFSE-based proliferation assays, with 33% of UD displaying net CFSE responses >1% to the HIV Gag antigen. Protein targeting in UD did not display the same immunodominance pattern as in HIV-infected individuals: UD recognized Gag, Env Nef and Pol protein products at relatively similar frequencies while in HI subjects, Gag was much more frequently and robustly recognized than Env antigens, consistent with previous reports (3, 19, 20). Intriguingly, short-term CD4 T cell lines derived from these responses in UD demonstrated functional differences when compared to the Thelper cells elicited by natural HIV infection. The functional affinity of the UD responses was variable but reached levels comparable to HI responses in some subjects, suggesting that they could respond to physiological antigen concentrations *in vivo*. The epitope recognition in Env was in part shared between UD and HI subjects, confirming the presence of T cells endowed with cross-reactive TCRs for HIV antigens in donors who are not highly exposed, uninfected individuals. These pre-existing responses could play an important role in shaping the immune response upon natural infection or vaccine administration. The next step will be to sort naïve and memory cells from UD and see which population proliferate. Naïve cells from HI donors will be also sort to compare with the UD.

We chose to use proliferation assays to detect these rare HIV-specific cells as this allowed us to measure functional responses able to expand rapidly upon natural antigen

presentation by interaction of the TCR with the HLA Class II/epitope complex. Such assays also act as amplifiers, enabling detection of low-frequency responses. This approach thus differs from techniques used previously in other studies investigating HIV-specific CD4 T cell responses in uninfected individuals, in which experiments based on Class II tetramers (11) or unspecific expansion (12) were performed. In spite of these differences, the results presented here are consistent with these previous findings, while providing new information on the functionality of the identified responses. Of note, in the RV144 trial, the baseline prevalence of CD4 T cell proliferative responses against the Env construct was of 24% (21), thus quite comparable to the frequency observed in our cohort (17%) when a cut-off of 1% net response was applied. The difference in magnitude of proliferative responses between both groups is probably mostly explained by lower frequencies of responses in PBMC between UD and HI subjects: ICS assays readily identified HIV-specific CD4 T cell responses in infected subjects, but failed to do so in UD individuals. Importantly, Gag was not as immunodominant here as compared to other gene products contrasting with a common observation in HI with chronic infection. In particular, Env recognition was comparatively more frequent. This suggests that precursors CD4 T cells for Env epitopes are not especially rare, consistent with previous data (12). Of note, we previously observed robust, but transient, responses at the time of acute infection that quickly fade (22). These data suggest that events occurring once infection is established dictate the strong Gag immunodominance, rather than the intrinsic immunogenicity of Env.

We confirmed the specificity of these responses by growing CD4 T cell lines specific for HIV antigens from UD and testing them by ICS, following restimulation, thus ruling out unspecific activation as the driver of the CFSE proliferative responses observed. These experiments also allowed a determination the functional profile of such cell lines, and to compare them to those from HI subjects. These data show that in spite of the *in vitro* expansion period, antigen-specific CD4 T cells maintain distinct phenotypes. HIV-specific CD4 T cells of UD robustly expressed TNF- $\alpha$  and CD40L but produced little IFN- $\gamma$ , while HI cell lines abundantly expressed IFN- $\gamma$ . Consequently, when these parameters (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  CD40L) were examined together, HI cell lines showed higher polyfunctionality than those of UD. Such mono-functional cells have been shown to be functional *in vivo*, as a single cytokine prevails in the CD4+ T cells of individuals vaccinated with the MVA-B vaccine (6). As this standard ICS panel favors detection of Th1-type of responses, it will be important to determine if UD responses are enriched in other CD4+ T cell functions, corresponding to other lineages of Thelper differentiation.

Given these functional differences, we asked whether the HIV-specific CD4+ T cell lines differed in their functional affinity, as the activation threshold may be an important parameter determining the ability of CD4+ T cells responding to HIV antigens in *in vitro* assays to also respond *in vivo*. The dose-responses curves determined for Env gp41-specific cell lines with serial dilutions of the cognate peptide pools, while performed on a limited number of individuals, showed interesting patterns: two UD subjects displayed quite different EC50s for all the markers examined (TNF- $\alpha$ , CD40L

and IFN- $\gamma$ ). The higher affinity CD4<sup>+</sup> T cell line was characterized by EC50s close to that of the HIV-infected donor, suggesting it could react similarly in exposed individuals.

Having clearly demonstrated the HIV antigen cross-reactivity of pre-existing CD4 T cell responses at the peptide pool level, we next demonstrate the presence of targeted epitopes shared by the UD and HI individuals. Such evidence is critical to support the notion of CD4 T cell clones harboring cross-reactive TCRs that can be boosted by HIV antigens. We observed one HIV negative donor (UD1) responding to 12 individual peptides and another HIV negative donor (UD3) responding to 5 individual peptides. The cell line generated with a HIV positive donor showed positive responses to 15 individual peptides of Gp41. A previous study identified 2 immunogenic peptides in HIV infected people (20); we used 3 peptides corresponding to the regions covered by these 2 immunogenic peptides, 170 (YIKIFIMIVGGLIGL), 171 (FIMIVGGLIGLRIVF) and 173 (IGLRIVFAVLSIVNR). These 3 peptides were able to induce detectable responses in both of our HIV negative donors, suggesting that the core epitopes are within the overlapping sequences.

Another studyAn additional study (23) also identified 2 immunogenic peptides in HIV-infected individuals that are covered by 2 of our overlapping peptides (170 and 173).

In the region spanning the amino acids 749 to 815 of the gp41 protein, was immunodominant, indeed within this region we identified 7 peptides, 187 (VDGFLALIWDDLRLSL), 188 (LALIWDDLRLSLCLFS), 191 (LFSYHRLRDLLLIVT), 194 (IVTRIVELLGRRGWE), 198 (LKYWWNLLQYWSQEL), 199 (WNLLQYWSQELKNSA) and 200 (QYWSQELKNSAVSLL) that were positive in one or both of our HIV negative donors. Four of these 7 peptides also elicited a response in the HI7 donor. This region and associated peptides represent new epitopes of interest, as only one peptide in this region (overlapping peptide 194) has previously been identified as eliciting a CD4 T cell response in natural HIV infection (24). In addition, the peptide 199 was the only peptide that induce responses from all the donors tested. This may make this sequence a good target for incorporation into vaccine immunogens.

In the HI7 donor, one peptide, 144 (QARVLAVERYLKDQQ), shares amino acid motives with 5 further peptides identified by other groups (7 groups in total) as immunogenic in HIV-infected people. In particular one 20-mer (VWGIKQLQARVLAVERYLKD) was identified by 3 different groups (25-27). The peptide 155 (EIWDNMTWMEWEREI) has a region overlapping a peptide previously shown to be immunogenic in infected people (28). The peptide 155 also overlaps 2 other peptides that were identified after a CD4 T cell priming of healthy donors (29, 30). Despite this, no detectable response was induced by the peptide 155 in either UD1 or UD3. The end of the gp41 protein appears to be immunogenic in HIV infected donors as 7 positive peptides are found between the position 805 and 851. None of these peptides produced a positive response in UD. 5 of these 7 peptides overlap with peptide reports in

the literature and 2 of them overlap a peptide that was identified when priming cells of HIV negative donors (30). The 3 others have an overlapping region with other immunogenic peptides identified by different groups in infected people.

Comparing the epitope targeting in UD by our strategy, which primarily detects recall memory CD4 T cell response, to *in vitro* priming with monocytes-derived dendritic cells (MDDCs) (22) provides valuable information. The latter study identified a 18-mer peptide (ALVSIVNRVRQGYSPLSF) that overlaps 2 of our peptides (173 and 175). This 18-mer was able to induce responses in HIV negative donors after a CD4 T cell priming similar to our cell line generation. The same study also detected this 18-mer peptide in donors during acute HIV infection. The response to this peptide is lost during chronic infection, which may explain why we did not detect a response for the peptides 173 and 175 in the HI7 donor, who is chronically infected.

The HIV-specific CD4 T cells that exist in a fraction of seronegative donors could be one of the determinants in the wide variability of HIV-specific responses in acute and chronic HIV infection. Should the presence of higher frequencies of pre-existing cross-reactive HIV-specific CD4 T cells favor larger responses at time of acute infection, it is unclear whether this would have a positive or negative impact on disease outcome. While CD4 T cell help is key for coordinated development of cellular and humoral immunity, HIV-specific CD4 T cells are preferentially infected compared to other specificities (31). Although challenging to address in humans, this issue could potentially

be addressed in rare cohorts of at-risk individuals that are followed longitudinally pre-and post-primary infection. Another potential consequence of these pre-existing responses is the modulation of the quality, magnitude and epitope specificity of vaccine-induced CD4 T cells. Future studies should thus investigate whether pre-immunization HIV-specific responses predict- at least to some extent - the characteristics of the Thelper immunity elicited by candidate immunogens. Finally, these results could impact on the choice of epitopes to be incorporated in future design of candidate vaccines.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Participants and Samples**

Peripheral blood was obtained from HIV-infected and uninfected individuals at the Royal Victoria Hospital and the Montreal General Hospital, Montreal, Canada. The study was approved by the respective Institutional Review Boards and written informed consent was obtained from all study participants prior to enrolment in the study. Leukapheresis were acquired as per standard procedures and PBMCs isolated by Ficoll density gradient were stored in liquid nitrogen (32).

### **CFSE proliferation assay**

All CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester) assays were performed using CD8-depleted PBMCs. Cryopreserved PBMC samples were thawed and CD8+ T cells depleted using Dynabeads CD8 Positive Isolation kit (Invitrogen) as per manufacturers instructions. CD8-depleted PBMCs were rested in RPMI supplemented with 10% human AB serum (Sigma) with 5mM HEPES and 0.5% penicillin/streptomycin 30 minutes at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> before the CFSE staining. CD8-depleted PBMCs were stained with CFSE (2.5mM Invitrogen) during 7 minutes, quenched with HAB serum, washed and then resuspended at 1 million/ml in fresh complete medium. CD8-depleted PBMCs were stimulated with HIV peptide pools (Gag, Env, Nef or Pol from JPT and gp41 or gp120 from NIH) at 1µg/ml or with PHA (5µg/ml, Sigma). Following overnight incubation in RPMI medium supplemented with 10% (vol/vol) human AB serum (Sigma), cells were washed, resuspended in fresh complete medium and incubated for an additional 6 days. Then, CD8-depleted cells were stained with directly-conjugated antibodies against CD3-V450, CD8-APC-H7, CD25-PE antibodies (BD Biosciences), CD4-APC antibody



(Biolegend) and analyzed by flow cytometry on an LSRII (BD Biosciences). The CFSE enables the monitoring of the proliferative history of cells: PBMC are originally staining with CFSE, which binds to free amine groups on cell proteins. Upon proliferation by cell division, CFSE content is halved and CFSE<sup>low</sup> cells correspond to cell having undergone mitosis. Lymphocytes were first defined by FSC-A and SSC-A. CD4 T cells were defined by CD4<sup>+</sup> T cells after had gate on CD3<sup>+</sup> cells. Positive CD25<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> CD4 T cell responses were defined as those at least twice the background in the non-stimulate condition and by a response above 1%. Donors with a high non-specific proliferation in this assay (defined as >3% in the unstimulated condition) were excluded from further analysis.

#### **CD4 T cell lines generation**

CD8-depleted PBMC were stimulated with the peptide of interest at 1 µg/ml in Xvivo15 supplemented with 10% HAB medium at a concentration of 4M/ml in FACS tubes. After an overnight incubation, cells were washed, resuspended in fresh medium at 2M/ml and plated in 24-well plates with 4M CD8-depleted PBMCs per well and incubated for a further 2 days. At day 3, recombinant interleukin-2 (IL-2, NIH) was added at 50U/ml. Cell lines were maintained by changing the half-medium when necessary or after a maximum of 3 days. After 10 to 12 days, the line were assessed for specificity by intracellular cytokine staining (ICS) for IFN-γ, TNF-α, CD40L and IL-2 as described below. Positive cell lines were determined by a specificity at least triple the one in the non-stimulate condition and by a specificity above 1%.

### **Intracellular cytokine staining assays**

CD8-depleted PBMCs or CD4 T cell lines were collected, resuspended in complete medium (X-vivo or RPMI) then incubated for 6h at 37°C with HIV peptide pools, individual HIV peptides or a CMV peptide pool at a final concentration of 0.5µg peptide/ml. After 1h of stimulation, monensin and Brefeldin A (BD Bioscience) were added. At least  $1 \times 10^6$  PBMCs were stained for the response to peptide pools and at least  $3 \times 10^5$  PBMCs were stained for the response to individual HIV peptides. Following stimulation samples were washed and resuspended in PBS with aquavidin (Invitrogen) for 20 minutes to stain the dead cells. Samples were then stained with the following antibodies; CD14-V500, CD19-V500, CD4-BV605, CD40L-PE, IFN- $\gamma$ -PECy7 and TNF- $\alpha$ -APC (BD Biosciences); CD3-BV650, PD1-BV421 and IL-2-AF488 (Biolegend) and CD8-APC-eF780 and CD69-PerCP-eF710 (eBioscience). The phenotyping antibody cocktail include the following five (5) markers: CD14, CD19, CD4, CD3 and CD8 and was incubate 20 minutes. Cytokines were evaluated by ICS including IL-2, CD40L, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CD69 and was incubate for 30 minutes. Samples were acquired on an LSRII flow cytometer (BD Bioscience). “Fluorescence minus one” (FMO) staining was used to define the cutoff for positivity/evaluate fluorescence spillover. Flow Jo (TreeStar Version 10) was used for analysis. Lymphocytes were defined by FSC-A and SSC-A; dead cells, CD14+ monocytes and CD19+ B cells were excluded. CD4 T cells were defined by CD4+ T cells expressing CD3 and/or CD69+ to account for CD3 downregulation upon activation.

### **Addition of monocytes**

Autologous monocytes were isolated from PBMCs with the EasySep Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion (Stem Cell) as per manufacturers instructions. Monocytes were resuspended at 2 million per ml in Xvivo15 supplemented with 10% human AB serum media and pulsed overnight with the gp41 peptide pool at a final concentration of 0.5µg/ml or with the gp41 individual peptides at a final concentration of 10µg/ml. After overnight incubation, monocytes were mixed with the the autologous cell line at a ratio of 1:5 (monocyte:cell line). The mix of monocytes and cell line was stimulated a second time with the same peptide pool at 0.5µg/ml or individual peptides at 10µg/ml for a further 6 hr. After 1h monensin (GolgiStop, BD Bioscience) and Brefeldin A (GolgiPlug, BD Bioscience) were added. Samples were analysed by ICS as described previously.

### **Statistics**

All statistical analyses were performed in Prism (V6, GraphPad). Non-parametric tests were used. For comparison between multiple groups, the Friedman one-way ANOVA with Dunn's multiple comparison post-test was used. For pair-wise analysis , Mann-Whitney two-tailed test was used. P values under 0.05 were considered significant.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

A.D. and D.E.K. designed the study; A.D, N.B. and R.C. performed experiments; J.P.R. managed study participant recruitment; L.B. and A.E.B provided input on study design; A.D. and D.E.K. interpreted the data and wrote the paper.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We want to thank Dr. Jean-Pierre Routy and Mrs. Josée Girouard from McGill University Health Centre for the participant recruitment; all the participants who donated blood for the study; the CRCHUM Flow Cytometry Platform and Dr Dominique Gauchat for the technical assistance.

This study was supported by the National Institutes of Health (AI100663 CHAVI-ID, HL-092565); the Canadian Institutes for Health Research (grant #137694), the FRQS AIDS and Infectious Diseases. D.E.K is supported by FRQS Research Scholar Award. J.P.R is the holder of Louis Lowenstein Chair, McGill University. The authors have no conflicts of interest to report.

## REFERENCES

1. **Queiroz AT, Santos LA, Moreau DR, Oliveira T, Watkins DI, Galvao-Castro B, Alcantara LC.** 2007. Identification and characterization of previously described epitopes in HIV-1 subtypes B, C, F and BF in Brazil. *Braz J Infect Dis* **11**:27-30.
2. **Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF.** 2013. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol* **11**:877-883.
3. **Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, Cosimi LA, Addo MM, Lichterfeld M, Altfeld M, Frahm N, Brander C, Sette A, Walker BD, Rosenberg ES.** 2004. Comprehensive Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD4 Responses Reveals Marked Immunodominance of gag and nef and the Presence of Broadly Recognized Peptides. *J Virol* **78**:4463-4477.
4. **Ranasinghe S, Flanders M, Cutler S, Soghoian DZ, Ghebremichael M, Davis I, Lindqvist M, Pereyra F, Walker BD, Heckerman D, Streeck H.** 2012. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J Virol* **86**:277-283.
5. **Riou C, Ganusov VV, Champion S, Mlotshwa M, Liu MK, Whale VE, Goonetilleke N, Borrow P, Ferrari G, Betts MR, Haynes BF, McMichael AJ, Gray CM.** 2012. Distinct kinetics of Gag-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during acute HIV-1 infection. *J Immunol* **188**:2198-2206.
6. **Gomez CE, Najera JL, Perdiguero B, Garcia-Arriaza J, Sorzano CO, Jimenez V, Gonzalez-Sanz R, Jimenez JL, Munoz-Fernandez MA, Lopez Bernaldo de Quiros JC, Guardo AC, Garcia F, Gatell JM, Plana M, Esteban M.** 2011. The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J Virol* **85**:11468-11478.
7. **de Souza MS, Ratto-Kim S, Chuenarom W, Schuetz A, Chantakulkij S, Nuntapinit B, Valencia-Micolta A, Thelian D, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Paris RM, Kaewkungwal J, Michael NL, Rerks-Ngarm S, Mathieson B, Marovich M, Currier JR, Kim JH.** 2012. The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. *J Immunol* **188**:5166-5176.
8. **Brehm MA, Pinto AK, Daniels KA, Schneck JP, Welsh RM, Selin LK.** 2002. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol* **3**:627-634.
9. **Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK.** 2010. Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev* **235**:244-266.
10. **Kwok WW, Tan V, Gillette L, Littell CT, Soltis MA, LaFond RB, Yang J, James EA, DeLong JH.** 2012. Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *J Immunol* **188**:2537-2544.
11. **Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM.** 2013. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity* **38**:373-383.

12. **Campion SL, Brodie TM, Fischer W, Korber BT, Rossetti A, Goonetilleke N, McMichael AJ, Sallusto F.** 2014. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4(+) T cells in unexposed blood donors. *J Exp Med* **211**:1273-1280.
13. **Crowell TA, Hatano H.** 2015. Clinical outcomes and antiretroviral therapy in 'elite' controllers: a review of the literature. *J Virus Erad* **1**:72-77.
14. **Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, Tighe DP, McMullen A, Brockman MA, Pavlik DF, Rodriguez-Garcia M, Pereyra F, Freeman GJ, Kavanagh DG, Kaufmann DE.** 2011. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood* **118**:965-974.
15. **Boritz E, Palmer BE, Wilson CC.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ T cells that proliferate in vitro detected in samples from most viremic subjects and inversely associated with plasma HIV-1 levels. *J Virol* **78**:12638-12646.
16. **Furman D, Jovic V, Sharma S, Shen-Orr SS, Angel CJ, Onengut-Gumuscu S, Kidd BA, Maecker HT, Concannon P, Dekker CL, Thomas PG, Davis MM.** 2015. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med* **7**:281ra243.
17. **Williams WB, Liao HX, Moody MA, Kepler TB, Alam SM, Gao F, Wiehe K, Trama AM, Jones K, Zhang R, Song H, Marshall DJ, Whitesides JF, Sawatzki K, Hua A, Liu P, Tay MZ, Seaton KE, Shen X, Foulger A, Lloyd KE, Parks R, Pollara J, Ferrari G, Yu JS, Vandergrift N, Montefiori DC, Sobieszczyk ME, Hammer S, Karuna S, Gilbert P, Grove D, Grunenberg N, McElrath MJ, Mascola JR, Koup RA, Corey L, Nabel GJ, Morgan C, Churchyard G, Maenza J, Keefer M, Graham BS, Baden LR, Tomaras GD, Haynes BF.** 2015. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science* **349**:aab1253.
18. **Gray GE, Laher F, Lazarus E, Ensoli B, Corey L.** 2016. Approaches to preventative and therapeutic HIV vaccines. *Curr Opin Virol* **17**:104-109.
19. **Gomez CE, Perdiguero B, Garcia-Arriaza J, Cepeda V, Sanchez-Sorzano CO, Mothe B, Jimenez JL, Munoz-Fernandez MA, Gatell JM, Lopez Bernaldo de Quiros JC, Brander C, Garcia F, Esteban M.** 2015. A Phase I Randomized Therapeutic MVA-B Vaccination Improves the Magnitude and Quality of the T Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Subjects on HAART. *PLoS One* **10**:e0141456.
20. **Buggert M, Norstrom MM, Czarnecki C, Tupin E, Luo M, Gyllensten K, Sonnerborg A, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M, Karlsson AC.** 2012. Characterization of HIV-specific CD4+ T cell responses against peptides selected with broad population and pathogen coverage. *PLoS One* **7**:e39874.
21. **Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prem Sri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH.** 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **361**:2209-2220.

22. **Lubong Sabado R, Kavanagh DG, Kaufmann DE, Fru K, Babcock E, Rosenberg E, Walker B, Lifson J, Bhardwaj N, Larsson M.** 2009. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PLoS One* **4**:e4256.
23. **De Groot AS, Marcon L, Bishop EA, Rivera D, Kutzler M, Weiner DB, Martin W.** 2005. HIV vaccine development by computer assisted design: the GAIA vaccine. *Vaccine* **23**:2136-2148.
24. **Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, Rodrigues H, Hammer J, Kallas EG, Sidney J, Sette A, Kalil J, Cunha-Neto E.** 2006. Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *AIDS* **20**:2263-2273.
25. **Malhotra U, Holte S, Zhu T, Delpit E, Huntsberry C, Sette A, Shankarappa R, Maenza J, Corey L, McElrath MJ.** 2003. Early induction and maintenance of Env-specific T-helper cells following human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **77**:2663-2674.
26. **Kloverpris H, Karlsson I, Bonde J, Thorn M, Vinner L, Pedersen AE, Hentze JL, Andresen BS, Svane IM, Gerstoft J, Kronborg G, Fomsgaard A.** 2009. Induction of novel CD8+ T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *AIDS* **23**:1329-1340.
27. **Roman VR, Jensen KJ, Jensen SS, Leo-Hansen C, Jespersen S, da Silva Te D, Rodrigues CM, Janitzek CM, Vinner L, Katzenstein TL, Andersen P, Kromann I, Andreasen LV, Karlsson I, Fomsgaard A.** 2013. Therapeutic vaccination using cationic liposome-adjuvanted HIV type 1 peptides representing HLA-supertype-restricted subdominant T cell epitopes: safety, immunogenicity, and feasibility in Guinea-Bissau. *AIDS Res Hum Retroviruses* **29**:1504-1512.
28. **Wahren B, Rosen J, Sandstrom E, Mathiesen T, Modrow S, Wigzell H.** 1989. HIV-1 peptides induce a proliferative response in lymphocytes from infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**:448-456.
29. **Cohen WM, Pouvelle-Moratille S, Wang XF, Farci S, Munier G, Charron D, Menez A, Busson M, Maillere B.** 2006. Scanning the HIV genome for CD4+ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA class II molecule. *J Immunol* **176**:5401-5408.
30. **Manca F, Fenoglio D, Valle MT, Li Pira G, Kunkl A, Ferraris A, Saverino D, Lancia F, Mortara L, Lozzi L, et al.** 1995. Human CD4+ T cells can discriminate the molecular and structural context of T epitopes of HIV gp120 and HIV p66. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **9**:227-237.
31. **Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA.** 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* **417**:95-98.
32. **Higdon LE, Lee K, Tang Q, Maltzman JS.** 2016. Virtual Global Transplant Laboratory Standard Operating Procedures for Blood Collection, PBMC Isolation, and Storage. *Transplant Direct* **2**:e101.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Prevalence and magnitude of proliferative CD4 T cell responses to HIV antigens in non-infected donors.** **A)** Example FACS plots of HIV-uninfected donors with proliferative responses to HIV antigens in 7-day CFSE assays. The percentage of CFSE<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup> cells is indicated in the upper left cadran of each plot. NS: non-stimulated control. PHA: phytohemagglutinin-stimulated positive control. **BC)** Magnitudes of HIV-specific proliferative CD4 T cell responses for the different antigens (HIV peptide pools) after subtraction of unstimulated background proliferation **B)** for HIV-negative donors (UD, n=18) and **C)** for HIV-infected subjects (HI, n=56). Note that the scale is not the same for both cohorts. The median include negative and positive responses. **D)** Comparative magnitude (median± interquartile range) of proliferative responses to HIV antigens in all subjects examined (UD :blue bars; HI: red bars). **E)** Prevalence of positive HIV-specific proliferative CD4 T cell responses for the HIV antigens tested. A response is considered positive when the net response is above 1% and when the raw data is at least twice that of the NS condition. Positive responses by these criteria are represented by closed symbols and negative responses by open symbols in **B)** and **C)**. Statistics shown are Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons (**BC)** and Mann-Whitney comparisons between UD and HI for each antigen (**D)**. Statistically significant differences are shown. \* p<0.05%; \*\* p<0.01%;\*\*\*p<0.001%; \*\*\*\*p<0.0001%. See also Fig S2.

**Figure 2. Functionality of Env gp41-specific short-term CD4 T cell lines derived from uninfected donors is dominated by TNF and CD40L.** **A)** CD8-depleted PBMCs were cultured after stimulation with a gp41 peptide pool for subject UD3 and HI7 or gag

peptide pool for subject UD18, and IL-2 was added at day 3. After 12 days the cells were washed, rested for 24h in a medium devoided of supplemental IL-2, and ICS performed on cells either restimulated with the gp41 pool, gag pool or left unstimulated. Flow cytometry plots represent expression patterns of CD69, TNF- $\alpha$ , CD40L, IFN- $\gamma$  and IL-2 in the CD4<sup>+</sup> T cells after a 6h restimulation. Numbers correspond to percentage of cells in each gates. **B)** Production of CD40L, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 in CD4<sup>+</sup> T cell lines from uninfected donors and **C)** from infected donors, after subtraction of the background, using the same experimental approach.

**Figure 3. HIV-specific CD4 T cell responses in uninfected donors are dominated by TNF- $\alpha$  and CD40L secretion.** **AD)** Pie chart representation of the production of TNF- $\alpha$ , CD40L and IFN- $\gamma$  by CD4 T cells from HIV-specific cell lines with the proportion of triple, double and single positive cells for each marker measured by ICS after a 6h stimulation **(A)** Cell lines from five HIV negative donors; **(D)** cell lines from three HIV-infected subjects. Patient's code and HIV antigen used are indicated below charts. **BE)** Fraction of total antigen-specific CD4 T cells (expressing any of the three markers) that express or do not express IFN- $\gamma$  in HIV negative donors **(B)** and HIV positive donors **(E)**. **CF)** Summary of polyfunctionality of HIV cell lines for HIV negative donors **(C)** and for HIV infected subjects **(F)**. One function represent single positive cells for TNF- $\alpha$ , CD40L or IFN- $\gamma$ , 2 functions represent the double positive cells and 3 functions represent the triple positive cells. **G)** Pie chart representation of cytokine production by CMVpp65 cell lines generated with 3 HIV negative donors. UD1 and UD3 are seropositive for CMV and UD10 is CMV seronegative. Statistical analyses Mann-Whitney test was applied for **B)** and Friedman test with Dunn's posttest for **C)**.

**Figure 4. Functional affinity of HIV-specific responses in CD4 T cell lines derived from uninfected donors is variable and can be improved by enhanced antigen presentation.** Gp41-specific CD4 T cell lines were derived from uninfected donors UD1 and UD3 and HIV-infected subject HI7 and assessed at day 12. **A-F)** 6-h ICS for three different markers (TNF- $\alpha$ , CD40L and IFN- $\gamma$ ) with corresponding dose-response curves according to Gp41 peptide pool concentration (**A, C, E**) and derived IC50 (**B, D, F**). **GH)** Net responses obtained for each marker in a 6h ICS assay (gp41 concentration: 0.5 mg/mL/peptide) with and without monocyte addition at a ratio of 1 monocyte: 5 CD4 T cell for donor UD3 (**G**) and donor UD1 (**H**). Four-parameter sigmoid dose-response curves (allowing for variable slope) were fitted onto the net values, with calculation of half-maximal effective dose (EC50) and corresponding 95% confidence interval (95%CI).

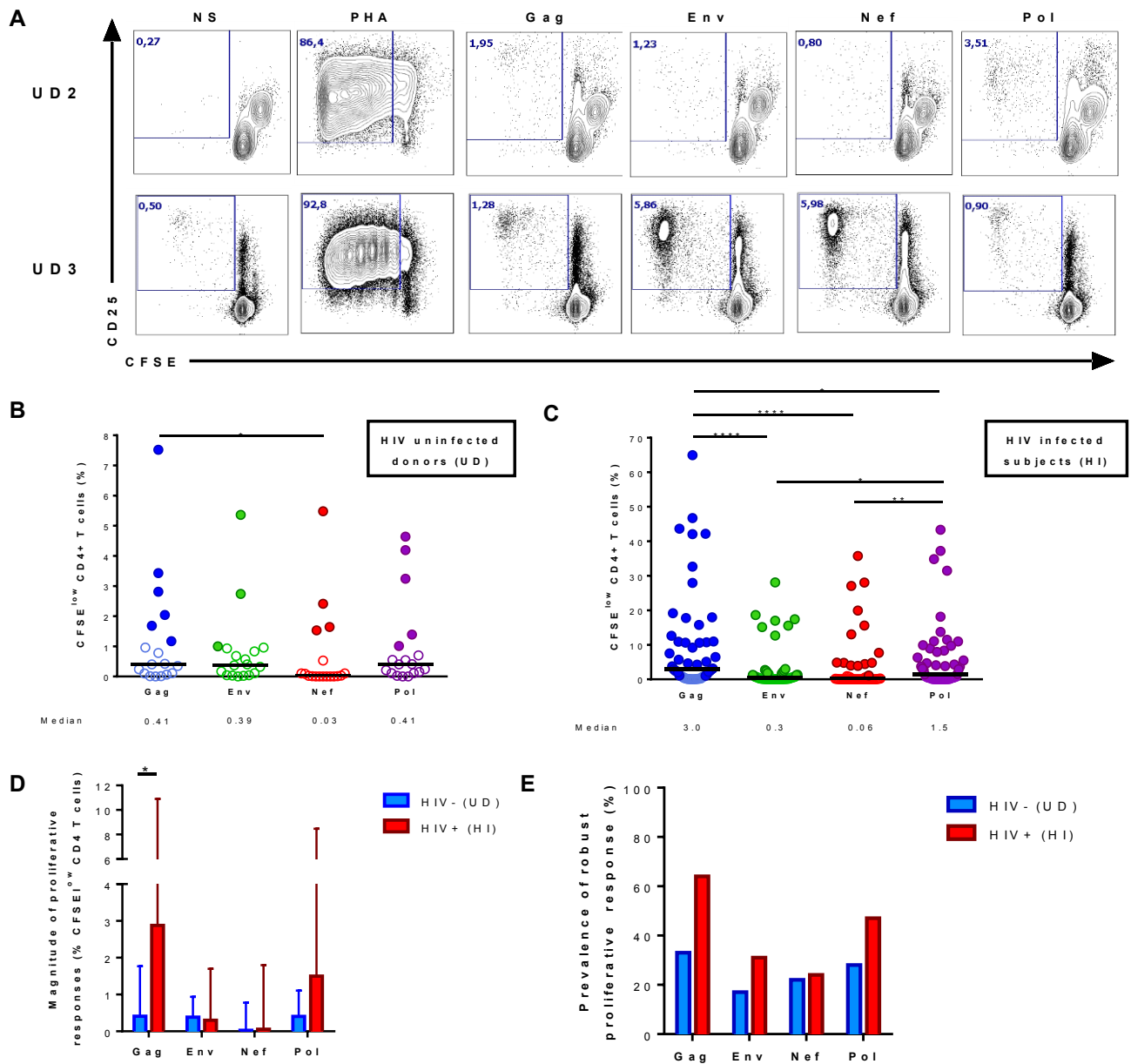
**Figure 5. Individual peptide recognition by CD4 T cells across the entire Env Gp41 protein in HIV infected and uninfected donors.** **AB)** Gp41 epitope mapping for 2 HIV negative donors, **A)** UD1 and **B)** UD3. **C)** Gp41 epitope mapping for the HIV positive donor HI7. The horizontal axis represent the 87 overlapping peptides spanning the Gp41 protein and the vertical axis represent the net percentage of specific response to each individual peptide. The specific response is determined as the net production of CD40L, TNF- $\alpha$  and/or IFN- $\gamma$  measured by ICS after a 6h stimulation. Amino acid sequences are indicated for robust responses (>2% net). Square boxes highlight peptides targeted in more than one individual.

**Supplemental Figure 1. Gating Strategy.** **A)** Gating strategy for the CFSE proliferation assay, starting at the left. The CFSE vs CD25 plot was analysed on the CD4+CD8-

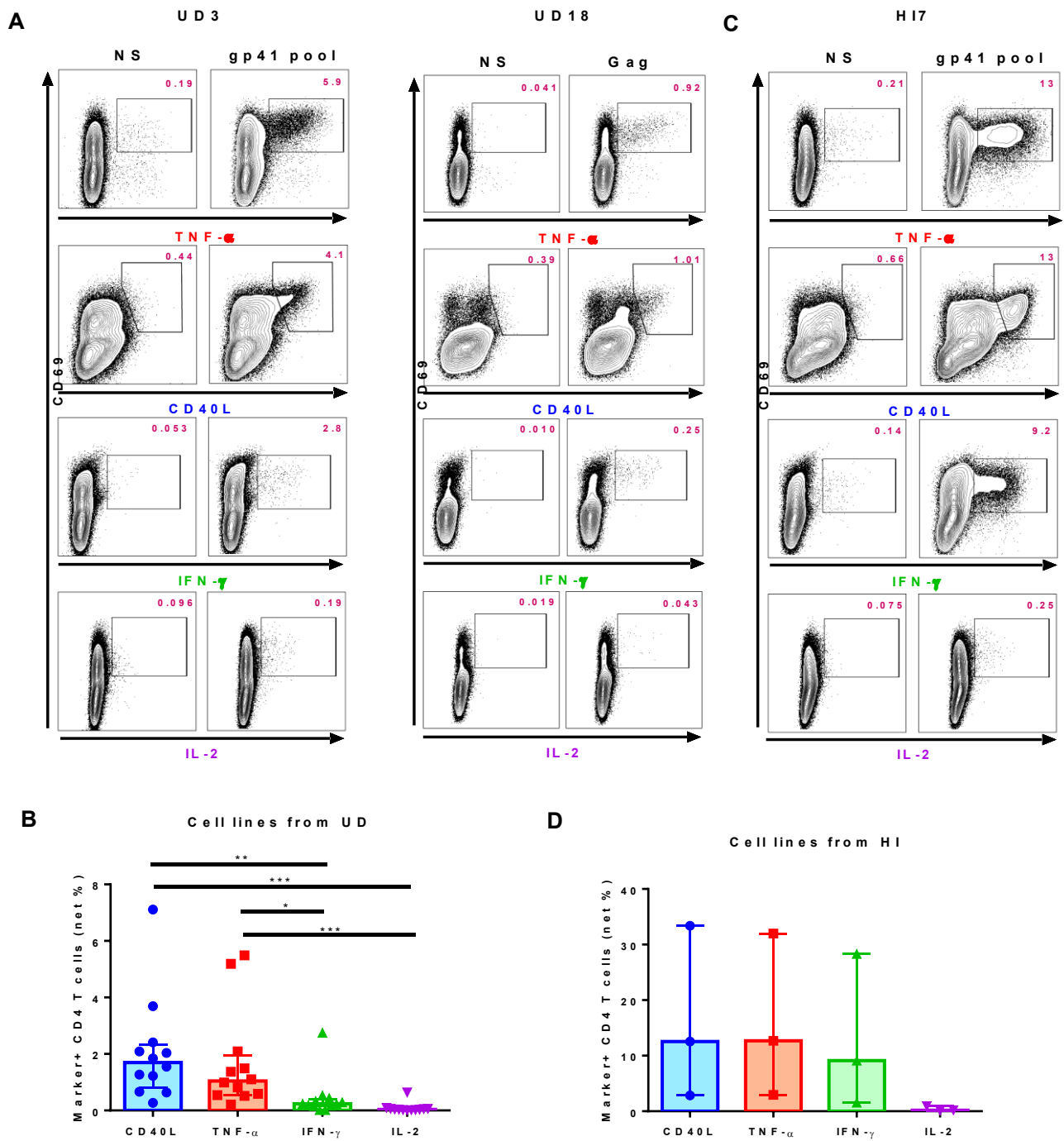
population. **B)** Gating strategy for the analysis of cytokine secretion by the cell lines. TNF-a, IFN-g, CD40L and IL-2 were analysed on the CD4+ population.

**Supplemental Figure 2. Prevalence and Magnitude of HIV-specific proliferative CD4 T cell responses in chronically infected individuals.** **A)** CFSE proliferation assay of 7 days from CD8-depleted PBMCs following different stimulations or non-stimulated (NS) for an HIV positive donor. The percentage of CFSE<sup>low</sup>CD25+ cells is indicated in the upper left quadrant of each plot. **B)** Magnitudes of proliferative HIV specific CD4 T cell responses for the different stimulations after subtraction of background for HIV untreated donors, **C)** HIV treated donors and **D)** HIV elite controller donors. **E)** Magnitudes of proliferative HIV specific CD4 T cell responses in HIV negative donors for the different stimulations after subtraction of background for CMV positive donors and **F)** CMV negative donors. **G)** Magnitudes of proliferative HIV specific CD4 T cell response in HIV negative donors for any of the 4 HIV antigen stimulations after subtraction of background for CMV+ and CMV- HIV negative donors. **H)** Magnitudes of proliferative CMV specific CD4 T cell responses for the different stimulations after subtraction of background for HIV negative donors and **I)** HIV positive donors. **J)** Magnitudes of proliferative CMV specific CD4 T cell responses for the different stimulations after subtraction of background for CMV- donors. A response is considered positive when the net response is above 1% and when the raw data is at least twice that of the NS condition. For each donor, proliferation against PHA was also tested and all the donors showed a proliferation.

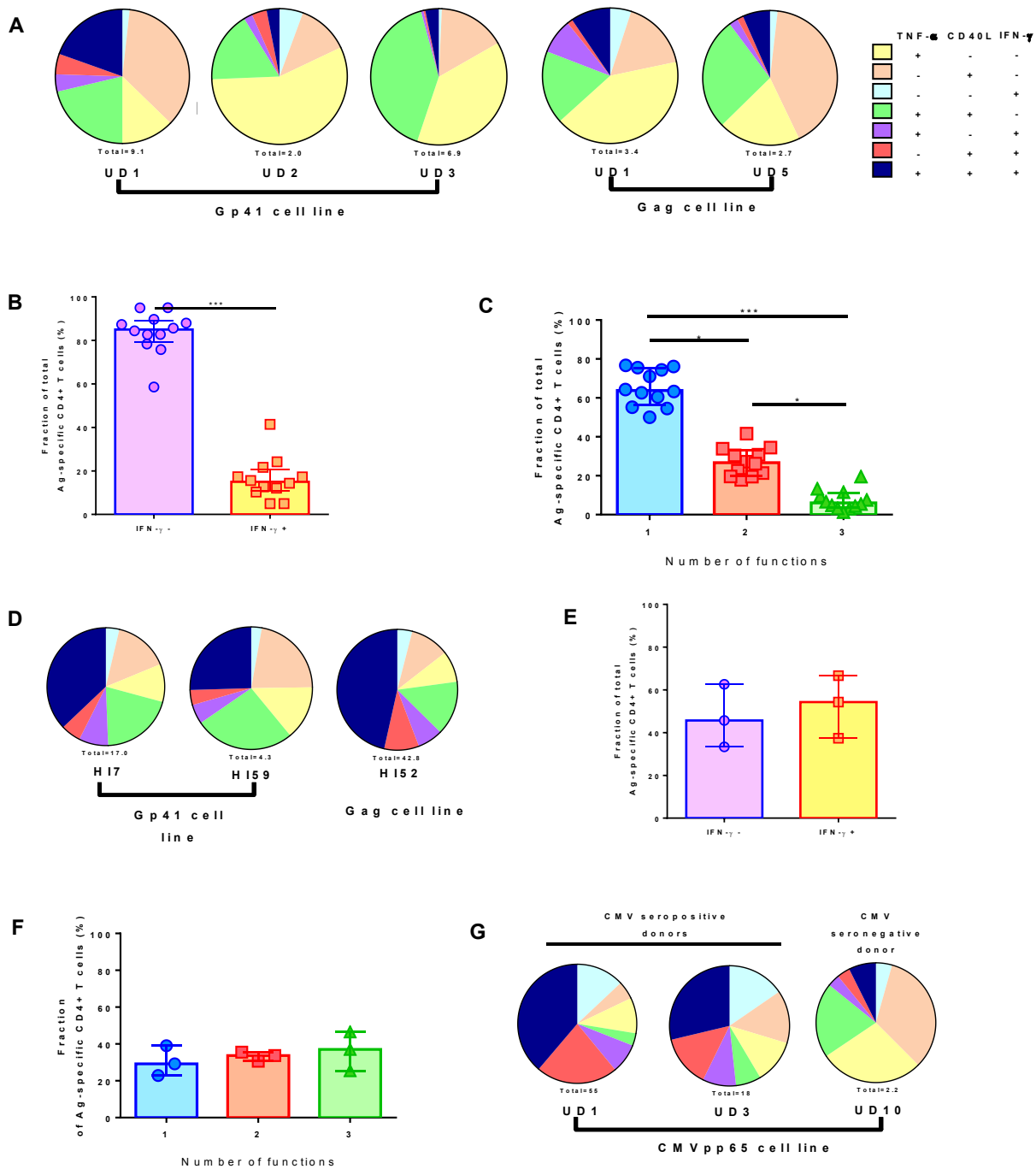
**Supplemental Figure 3. Enhanced antigen presentation does not improve responsiveness of HIV-specific CD4 T cell lines in infected donors.** Gp41-specific CD4 T cell line was derived from HIV-infected subject HI7 and assessed at day 12. **A)** Net responses obtained for each marker in a 6h ICS assay (gp41 concentration: 0.5 mg/mL/peptide) with and without monocyte addition at a ratio of 1 monocyte: 5 CD4 T cell for donor HI7.



**Figure 1. Prevalence and magnitude of proliferative CD4 T cell responses to HIV antigens in non-infected donors.** **A**) Example FACS plots of HIV-uninfected donors with proliferative responses to HIV antigens in 7-day CFSE assays. The percentage of CFSE<sup>low</sup> CD25+ cells is indicated in the upper left cadran of each plot. NS: non-stimulated control. PHA: phytohemagglutinin-stimulated positive control. **B** **C**) Magnitudes of HIV-specific proliferative CD4 T cell responses for the different antigens (HIV peptide pools) after subtraction of unstimulated background proliferation **B**) for HIV-negative donors (UD, n=18) and **C**) for HIV-infected subjects (HI, n=56). Note that the scale is not the same for both cohorts. The median include negative and positive responses. **D**) Comparative magnitude (median ± interquartile range) of proliferative responses to HIV antigens in all subjects examined (UD: blue bars; HI: red bars). **E**) Prevalence of positive HIV-specific proliferative CD4 T cell responses for the HIV antigens tested. A response is considered positive when the net response is above 1% and when the raw data is at least twice that of the NS condition. Positive responses by these criteria are represented by closed symbols and negative responses by open symbols in **B**) and **C**). Statistics shown are Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons (**B** **C**) and Mann-Whitney comparisons between UD and HI for each antigen (**D**). Statistically significant differences are shown. \* p < 0.05%; \*\* p < 0.01%; \*\*\* p < 0.001%; \*\*\*\* p < 0.0001%. See also Fig S2.

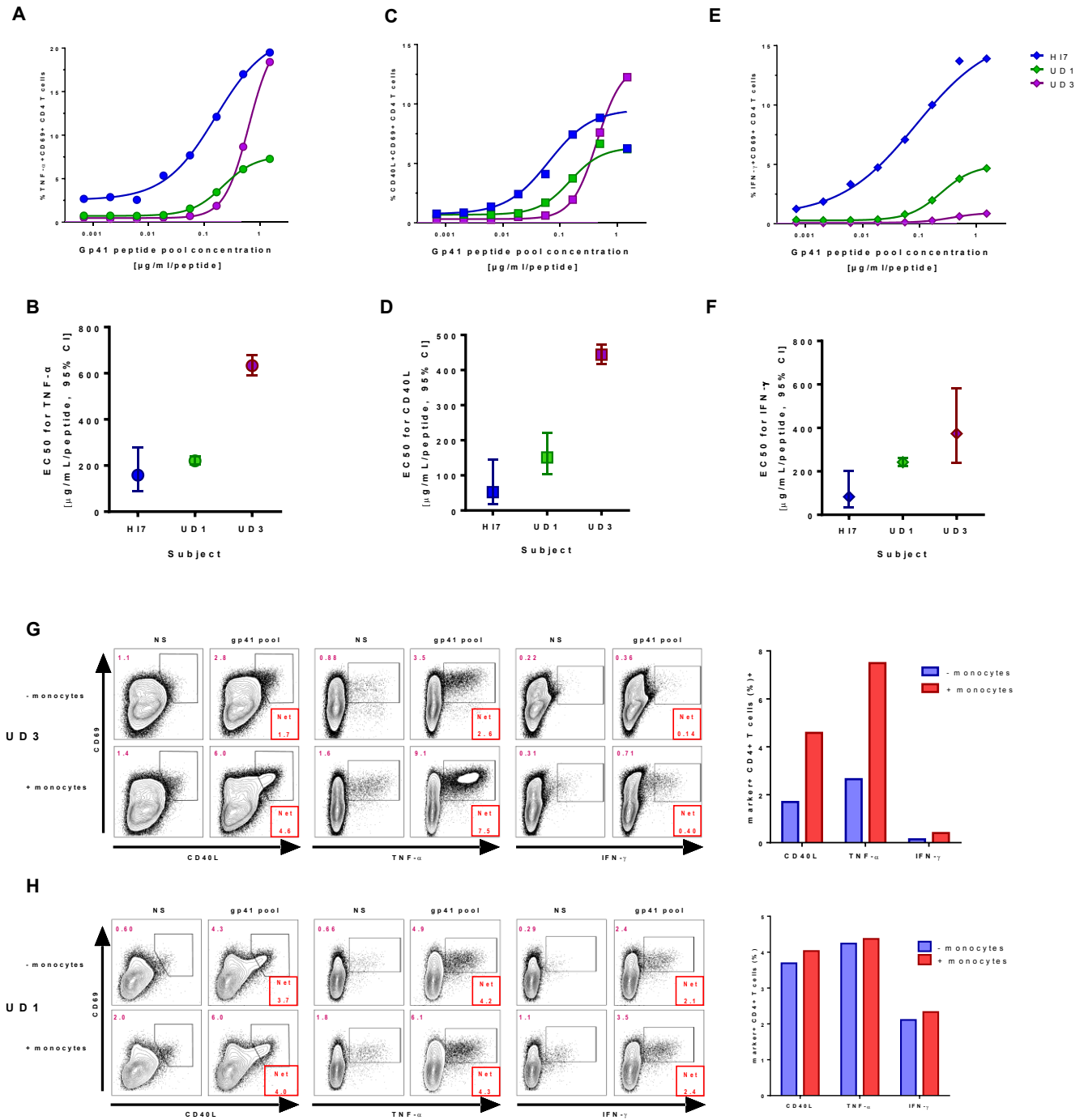


**Figure 2. Functionality of Env gp41-specific short-term CD4 T cell lines derived from uninfected donors is dominated by TNF and CD40L. A)** CD8-depleted PBMCs were cultured after stimulation with a gp41 peptide pool for subject UD3 and H17 or gag peptide pool for subject UD18, and IL-2 was added at day 3. After 12 days the cells were washed, rested for 24h in a medium devoided of supplemental IL-2, and ICS performed on cells either restimulated with the gp41 pool, gag pool or left unstimulated. Flow cytometry plots represent expression patterns of CD69, TNF- $\alpha$ , CD40L, IFN- $\gamma$  and IL-2 in the CD4+ T cells after a 6h restimulation. Numbers correspond to percentage of cells in each gates. **B)** Production of CD40L, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 in CD4+ T cell lines from uninfected donors and **C)** from infected donors, after subtraction of the background, using the same experimental approach.

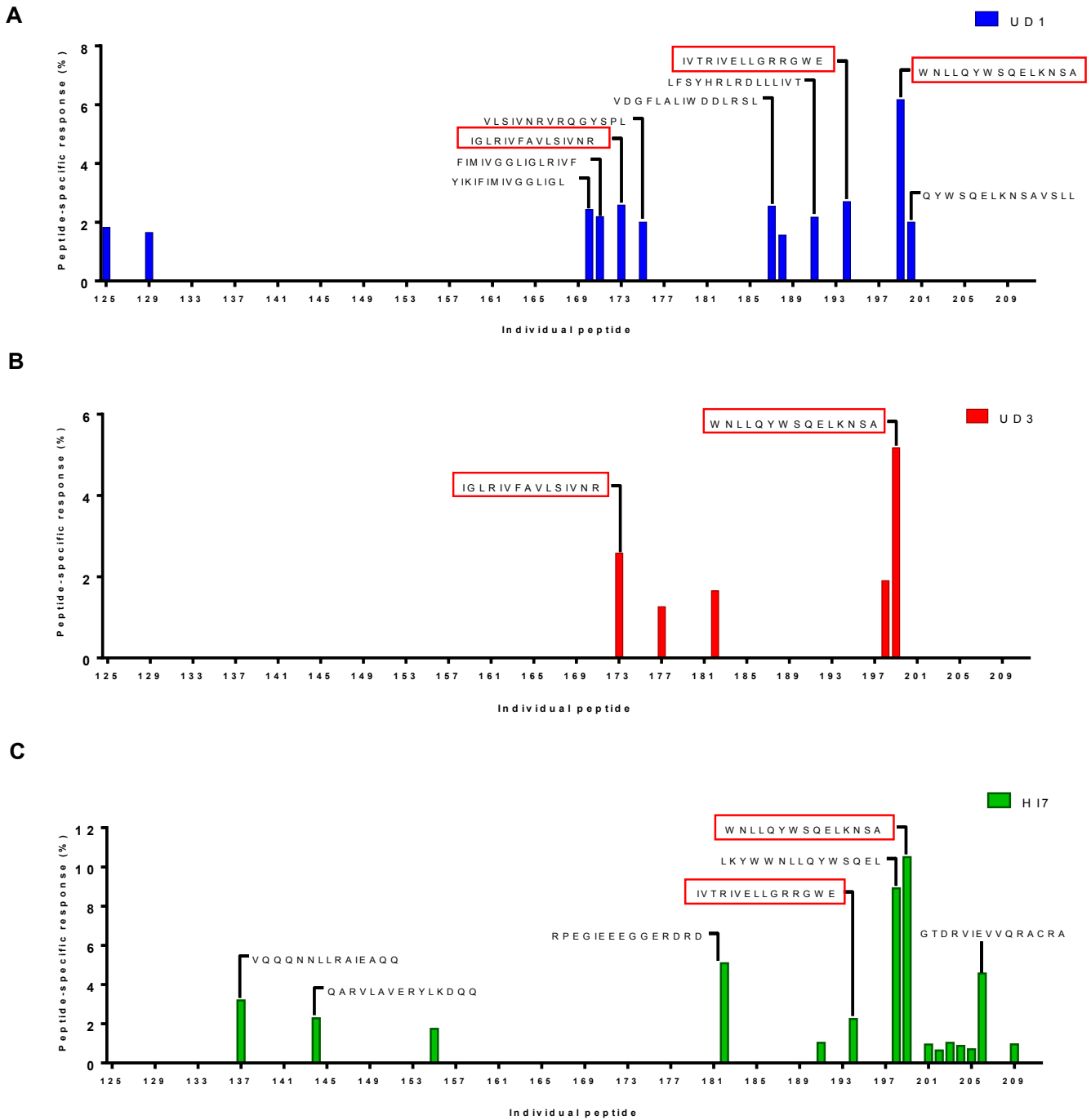


**Figure 3. HIV-specific CD4 T cell responses in uninfected donors are dominated by TNF- $\alpha$  and CD40L secretion. A-D) Pie chart representation of the production of TNF- $\alpha$ , CD40L and IFN- $\gamma$  by CD4 T cells from HIV-specific cell lines with the proportion of triple, double and single positive cells for each marker measured by ICS after a 6 h stimulation (A) Cell lines from five HIV negative donors; (D) cell lines from three HIV-infected subjects. Patient's code and HIV antigen used are indicated below charts. B-E) Fraction of total antigen-specific CD4 T cells (expressing any of the three markers) that express or do not express IFN- $\gamma$  in HIV negative donors (B) and HIV positive donors (E). C-F) Summary of polyfunctionality of HIV cell lines for HIV negative donors (C) and for HIV infected subjects (F). One function represent single positive cells for TNF- $\alpha$ , CD40L or IFN- $\gamma$ , 2 functions represent the double positive cells and 3 functions represent the triple positive cells. G) Pie chart representation of cytokine production by CMVpp65 cell lines generated with 3 HIV negative donors. UD 1 and UD 3 are seropositive for CMV and UD 10 is CMV seronegative. Statistical analyses Mann-Whitney test was applied for B) and Friedman test with Dunn's posttest for C).**





**Figure 4. Functional affinity of HIV-specific responses in CD4 T cell lines derived from uninfected donors is variable and can be improved by enhanced antigen presentation.** Gp41-specific CD4 T cell lines were derived from uninfected donors UD1 and UD3 and HIV-infected subject H17 and assessed at day 12. **A-F**) 6-h ICS for three different markers (TNF- $\alpha$ , CD40L and IFN- $\gamma$ ) with corresponding dose-response curves according to Gp41 peptide pool concentration (**A, C, E**) and derived IC50 (**B, D, F**). **G-H**) Net responses obtained for each marker in a 6h ICS assay (gp41 concentration: 0.5  $\mu$ g/ml L/peptide) with and without monocyte addition at a ratio of 1 monocyte: 5 CD4 T cell for donor UD3 (**G**) and donor UD1 (**H**). Four-parameter sigmoid dose-response curves (allowing for variable slope) were fitted onto the net values, with calculation of half-maximal effective dose (EC50) and corresponding 95% confidence interval (95% C.I.).



**Figure 5. Individual peptide recognition by CD4 T cells across the entire Env Gp41 protein in HIV infected and uninfected donors. AB) Gp41 epitope mapping for 2 HIV negative donors, A) UD1 and B) UD3. C) Gp41 epitope mapping for the HIV positive donor H17. The horizontal axis represent the 87 overlapping peptides spanning the Gp41 protein and the vertical axis represent the net percentage of specific response to each individual peptide. The specific response is determined as the net production of CD40L, TNF- $\alpha$  and/or IFN- $\gamma$  measured by ICS after a 6h stimulation. Amino acid sequences are indicated for robust responses (>2% net). Square boxes highlight peptides targeted in more than one individual.**

**Table 1. Baseline characteristics of HIV-negative subjects and identification of robust HIV-specific proliferative CD4 T cell responses**

Donor	Gender	Age	CD4 count	CMV Status	Gag proliferative response (%) #	Env proliferative response (%) #	Nef proliferative response (%) #	Pol proliferative response (%) #	HLA-DRB1
<b>UD1</b>	<b>M</b>	<b>63</b>	<b>448</b>	<b>+</b>	<b>3,43</b>		<b>1,64</b>	<b>4,19</b>	13:01/16:01
<b>UD2</b>	<b>M</b>	<b>23</b>	<b>451</b>	<b>-</b>	<b>1,68</b>			<b>3,24</b>	13:02/13:02
<b>UD3</b>	<b>F</b>	<b>37</b>	<b>1097</b>	<b>+</b>		<b>5,36</b>	<b>5,48</b>		04:01/15:01
<b>UD4</b>	<b>M</b>	<b>59</b>	<b>882</b>	<b>-</b>			<b>2,41</b>		01:01/11:04
UD5	M	58	271	-					04:01/13:01
<b>UD6</b>	<b>M</b>	<b>39</b>	<b>1400</b>	<b>+</b>					13:03/15:03
UD7	M	66	599	+					03:01/07:01
UD8	M	22	445	-					04:01/13:02
UD9	M	55	518	+					03:01/16:01
<b>UD10</b>	<b>M</b>	<b>62</b>	<b>827</b>	<b>-</b>	<b>7,52</b>		<b>1,53</b>	<b>4,64</b>	03:01/09:01
<b>UD11</b>	<b>M</b>	<b>62</b>	<b>789</b>	<b>+</b>		<b>1</b>		<b>1,39</b>	03:01/03:01
UD12	F	37	705	+					01:01/15:01
UD13*	M	51	922	-					03:01/13:01
UD14*	M	70	771	+					13:02/16:01
UD15	F	44	754	-					01:01/16:01
<b>UD16</b>	<b>M</b>	<b>27</b>	<b>1368</b>	<b>+</b>	<b>1,17</b>			<b>1,01</b>	01:01/15:01
<b>UD17</b>	<b>M</b>	<b>43</b>	<b>1053</b>	<b>-</b>	<b>2,04</b>				03:01/15:01
<b>UD18</b>	<b>F</b>	<b>39</b>	<b>1488</b>	<b>-</b>	<b>2,81</b>	<b>2,74</b>			07:01/13:01
Median	78% male	47 (22-70)	780 (271-1488)	50% positive					

\*at higher risk for exposition to HIV (unprotected sexual intercourse with an HIV-infected partner)

# Net proliferation, defined as %CFSE low CD4 T cells [HIV Ag]- %CFSE low CD4 T cells [No Ag]

# Indicated only if net proliferation considered robust, i.e. Net proliferation > 1% and net proliferation > 2\* background (%CFSE low CD4 T cells [No Ag])

**Table 2. Baseline characteristics of the HIV positive subjects in our cohort**

Donor	Gender	Age	ART status	Subject category*	CD4 count	Viral load	CMV Status	HLA-DRB1
HI1	M	59	No	EC	672	< 40	+	03:01/13:02
HI2	F	51	No	EC	434	< 40	+	13:01/15:01
HI3	F	35	No	EC	369	< 40	+	12:01/13:01
HI4	F	47	No	EC	744	< 40	+	04:04/15:01
HI5	F	31	On	EC	708	< 40	+	01:01/07:01
HI6	F	40	No	EC	700	< 40	+	
HI7	M	42	On	ART-treated	779	< 40	+	03:01/15:01
HI8	M	19	On	ART-treated	708	< 40	+	01:02/11:02
HI9	M	51	On	ART-treated	533	< 40	+	01:01/08:01
HI10	M	56	On	ART-treated	865	< 40	+	
HI11	M	61	On	ART-treated	499	< 40	-	13:02/13:02
HI12	M	58	On	ART-treated	728	< 40	-	01:01/13:01
HI13	M	43	On	ART-treated	793	< 40	+	13:02/14:02
HI14	M	38	On	ART-treated	1091	< 40	+	04:07/15:01
HI15	M	59	On	ART-treated	843	< 40	+	
HI16	M	63	On	ART-treated	782	< 40	+	04:03 or 04:04/15:01
HI17	M	51	On	ART-treated	941	< 40	+	07:01/11:01
HI18	M	58	On	ART-treated	563	< 40	+	13:01/15:01
HI19	M	31	On	ART-treated	1009	< 40	+	04:04/07:01
HI20	M	55	On	ART-treated	536	< 40	+	07:01/16:01
HI21	M	58	On	ART-treated	577	< 40	+	11:01/13:01
HI22	M	46	On	ART-treated	503	< 40	-	
HI23	M	50	On	ART-treated	1110	< 40	+	07:01/15:01
HI24	M	48	On	ART-treated	395	< 40	+	08:01/11:04
HI25	M	46	On	ART-treated	N/A†	< 40	+	08:02/12:01
HI26	M	55	On	ART-treated	372	< 40	-	03:01/03:01
HI27	M	35	On	ART-treated	542	< 40	+	03:01/07:01
HI28	M	42	On	ART-treated	453	68	+	07:01/11:04
HI29	M	55	On	ART-treated	398	74	-	07:01/14:01
HI30	M	52	On	ART-treated	333	< 40	+	11:01/13:02
HI31	M	45	On	ART-treated	123	100	+	07:01/13:01
HI32	M	51	On	ART-treated	158	< 40	+	03:01/15:01
HI33	M	31	On	ART-treated	394	49	+	11:01/11:04
HI34	M	24	On	ART-treated	394	< 40	-	08:03/15:01
HI35	M	58	On	ART-treated	278	< 40	+	07:01/15:01
HI36	M	44	On	ART-treated	403	< 40	+	03:02/15:01
HI37	M	47	On	ART-treated	356	< 40	+	04:01/15:01
HI38	M	70	On	ART-treated	381	< 40	+	03:01/04:04
HI39	M	58	On	ART-treated	619	< 40	+	
HI40	M	56	On	ART-treated	677	< 40	+	
HI41	M	28	On	ART-treated	694	< 40	+	04:07/07:01
HI42	M	48	No	UNT	416	15250	+	03:01/07:01
HI43	M	45	No	UNT	228	73109	+	07:01/13:01
HI44	M	43	No	UNT	356	193437	+	08:03/11:02
HI45	M	22	No	UNT	329	19067	+	11:01/11:01
HI46	M	47	No	UNT	186	17902	+	04:05/11:02
HI47	M	25	No	UNT	404	2738	+	08:01/15:01
HI48	M	34	No	UNT	300	1000000	+	03:02/11:02
HI49	M	38	No	UNT	138	14614	+	14:02/14:06
HI50	M	41	No	UNT	406	6671	+	11:01:01/13:03
HI51	M	38	No	UNT	320	132886	+	04:06/08:01
HI52	M	38	No	UNT	1036	6235	+	04:04/07:01
HI53	M	24	No	UNT	971	16316	+	04:03/12:01
HI54	M	47	No	UNT	492	39489	+	03:01/03:01
HI55	M	22	No	UNT	597	35859	+	04:02/15:01
HI56	M	40	No	UNT	571	6678	+	
HI57	M	50	No	UNT	383	79043	+	03:01/03:01
HI58	M	22	No	UNT	750	286	+	11:01/13:02
HI59	M	46	No	UNT	504	667	+	03:01/04:04
median					503 (123-	40 (40-1000000)		90% positive
					1110)			

\*Subject category: EC (elite controller), UNT (untreated progressor) and VC (viremic controller)

† N/A non-available

**Table 3. Basic characteristics of the HIV-specific CD4 T cell lines and of the subjects from whom they were derived**

Donor	HIV Status	Subject group**	CD4 count	Viral load†	CMV Status	CMVpp65				Gag				Env (combined gp41 and gp120 pools)				Gp41#			
						proliferation CFSE (%)		cell line specificity (%)		proliferation CFSE (%)		cell line specificity (%)		proliferation CFSE (%)		cell line specificity (%)		proliferation CFSE (%)		cell line specificity (%)	
						robust	No Ag	CMVpp65	No Ag	CMVpp65	robust	No Ag	Gag	No Ag	Gag	robust	No Ag	Env	No Ag	Env	No Ag
UD1	-	UD	450	N/A	+	yes	0,95	64	0,57	55	yes	0,95	4,4	3,4	no	0,95	1,5	0,45	3,2	0,35	9,1
UD2	-	UD	465	N/A	-	no	0,14	0,3			yes	0,14	1,4	2	no	0,14	0,93			0,49	2
UD3	-	UD	667	N/A	+	yes	0,51	9,6	0,83	18				2,9	yes	0,51	5,9			0,59	6,9
UD5	-	UD	271	N/A	-									2,7	no	0	0,03	0,31	1,3		
UD6	-	UD	1400	N/A	+				0,59	42	yes	0,09	1,1	1,1	no	0,09	0,92	0,74	3,2		
UD7	-	UD	599	N/A	+	no	0,02	0,13	0,42	2,8					no	0,02	0,19				
UD10	-	UD	256	N/A	-	yes	0,88	5,6	0,62	2,2	yes	0,88	8,4		no	0,88	1,3				
UD11	-	UD	789	N/A	+	yes	0,05	8,6	0,31	45					yes	0,05	1,1				
UD17	-	UD	1053	N/A	-	no	1,1	0,35							no	1,1	2,1				
UD18	-	UD	1488	N/A	-	no	2,7	3,9			yes	2,7	5,5	1,4	yes	2,7	5,4				
H17	+	ART	779	<40	+	yes	0,55	4,3	0,14	56	yes	0,55	33		yes	0,55	2,2			0,86	17
H152	+	UNT	1036	6235	+	yes	1,63	66	0,19	49	yes	1,63	12	43	no	1,63	2,1				
H159	+	UNT	504	667	+	yes	0,88	31	0,44	42	yes	0,88	12		yes	0,88	2,7			0,58	4,3

\* Subject category: UD (uninfected donor), UNT (untreated progressor), ART (ART-treated)

† N/A not applicable

# CFSE assays were run for Env (combined gp210 and gp41 peptide pools), not for gp120 and gp41 separately

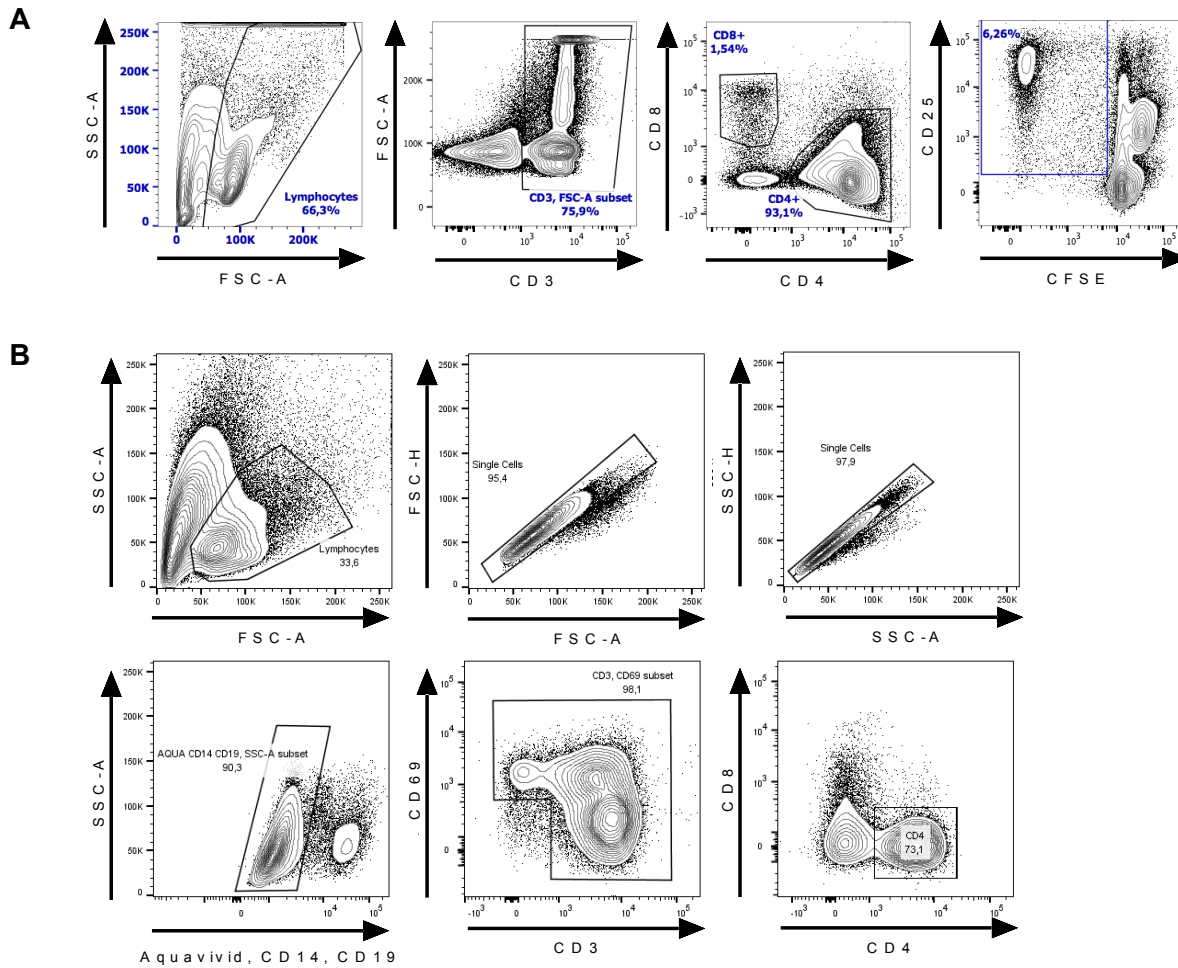
**Table 4.** HIV negative individuals target some immunodominant epitopes shared with infected people

peptide number	HXB2 location of gp160	Sequence	UD1 (EG1148)	UD3 (FM1317)	HI7 (MM1205)	response in literature	Reference	sequence tested*	Type of peptide set
125	501-515	AKRRVVQREKRAVGI	x						
129	517-531	AMFLGFLGAAGSTMG	x						
137	549-563	VQQQNLLRAIEAQQ			x	immunogenic in infected people	Wahren 1989	<b>GIVQQQNLLRAIEA</b>	15 mer
144	577-592	QARVLAVERYLKDQQ			x	detection in 5% of infected people	Buggert 2012	<b>GIKQLQARVLAVERY</b>	15 mer
						immunogenic in infected people	Malhotra 2003, Klooverpris 2009, Roman 2013	<b>VWGIKQLQARVLAVERYLKD</b>	20 mer
						immunogenic in infected people	Schrier 1989	<b>RILAVERYLKDQQLLGIWGCSSGLIC</b>	25 mer
						detection in healthy donor who received a DNA vaccine and a rAd5 boost	Koup 2010	<b>LTWGIKQLQARVLAGIKQLQARVLAVERY</b>	30 mer
						detection in 12% of infected people	Ranasinghe 2012	<b>GIKQLQARVLAVERYLK</b>	17 mer
155	621-635	EIQWNTMWEWEREI			x	immunogenic for priming HIV- donors	Cohen 2006	<b>EIQWNTMWEWEREI</b>	15 mer
						immunogenic for priming HIV- donors	Manca 1995	<b>WSNKSLEDIWDMTWC</b>	15 mer
						immunogenic in infected people	Wahren 1989	<b>IKLFIMIVGGLVGLR</b>	15 mer
170	681-695	YIKIFIMIVGGLIGL	x			immunogenic in infected people	DeGroot 2005	<b>IVGGLIGLRIVFAVLSIVNRVRQ</b>	23 mer
						detection in 2,5% of infected people	Buggert 2012	<b>RTFIMIVGGLIGLR</b>	15 mer
171	685-699	FIMIVGGLIGLRIVF	x			detection in 2,5% of infected people	Buggert 2012	<b>RTFIMIVGGLIGLR</b>	15 mer
173	693-707	IGLRIVFAVLSIVNR	x	x		detection in 5% of infected people	Buggert 2012	<b>FVLSIVNRVRQGYSS</b>	15 mer
						immunogenic in infected people	DeGroot 2005	<b>RIVFAVLSIVNRVRQGYSSPLSFQ</b>	23 mer
						immunogenic in infected people	DeGroot 2005	<b>IVGGLIGLRIVFAVLSIVNRVRQ</b>	23 mer
						priming of HIV- donors and detected in acute infection (lost in chronic infection)	LubongSabado 2009	<b>ALVSIIVNRVRQGYSSPLSF</b>	18 mer
175	701-715	VLSIVNRVRQGYSSPL	x			priming of HIV- donors and detected in acute infection (lost in chronic infection)	LubongSabado 2009	<b>ALVSIIVNRVRQGYSSPLSF</b>	18 mer
177	709-723	RQGYSSPLSFQTRLPA		x					
182	729-743	RPEGIEEGGERDRD		x	x	immunogenic in infected people	Schrier 1989	<b>GIEEGGERDRD</b>	13 mer
187	749-763	VDGFLALIWDDLRLSL	x						
188	753-767	LALIWDDLRLSLCLFS	x						
191	765-779	LFSYHRLRDLILLIIVT	x		x				
194	777-791	IVTRIVELLGRRGWE	x		x	immunogenic in infected people	Fonseca 2006	<b>RDLLLIIVTRIVELLGR</b>	16 mer
198	793-807	LKYWNLLQYWSQEL		x	x				
199	797-811	WNLLQYWSQELKNSA	x	x	x				
200	801-815	QYWSQELKNSAVSLL	x						
201	805-819	QELKNSAVSLLNATA			x				
202	809-823	NSAVSLLNATAIAVA			x				
203	813-827	SLLNATAIAVAEGTD			x	immunogenic for priming HIV- donors	Manca 1995	<b>WLNATAIAVTEGTDRC</b>	16 mer
204	817-831	ATAIIVAEGTDRVIE			x	immunogenic for priming HIV- donors	Manca 1995	<b>WLNATAIAVTEGTDRC</b>	16 mer
205	821-835	AVAEGTDRVIEVVQR			x	immunogenic in infected people	Caruso 1997	<b>YVAEGTDRVIEVVQACR</b>	18 mer
206	825-839	GTDRVIEVVQRACRA			x	immunodominant in highly expose HIV- and detect in infected childrens	Maddows-Taylor 2004, Clerici 1994, Pinto 1995 and Kaul 1999	<b>DRVIEVVQAYRAIR</b>	15 mer
						immunogenic in infected people	Caruso 1997	<b>YVAEGTDRVIEVVQACR</b>	18 mer
209	837-851	CRAILHPRRIRQGL			x	immunogenic in infected people	Berzofsky 1991	<b>AIRHPRRIRQGLER</b>	15 mer

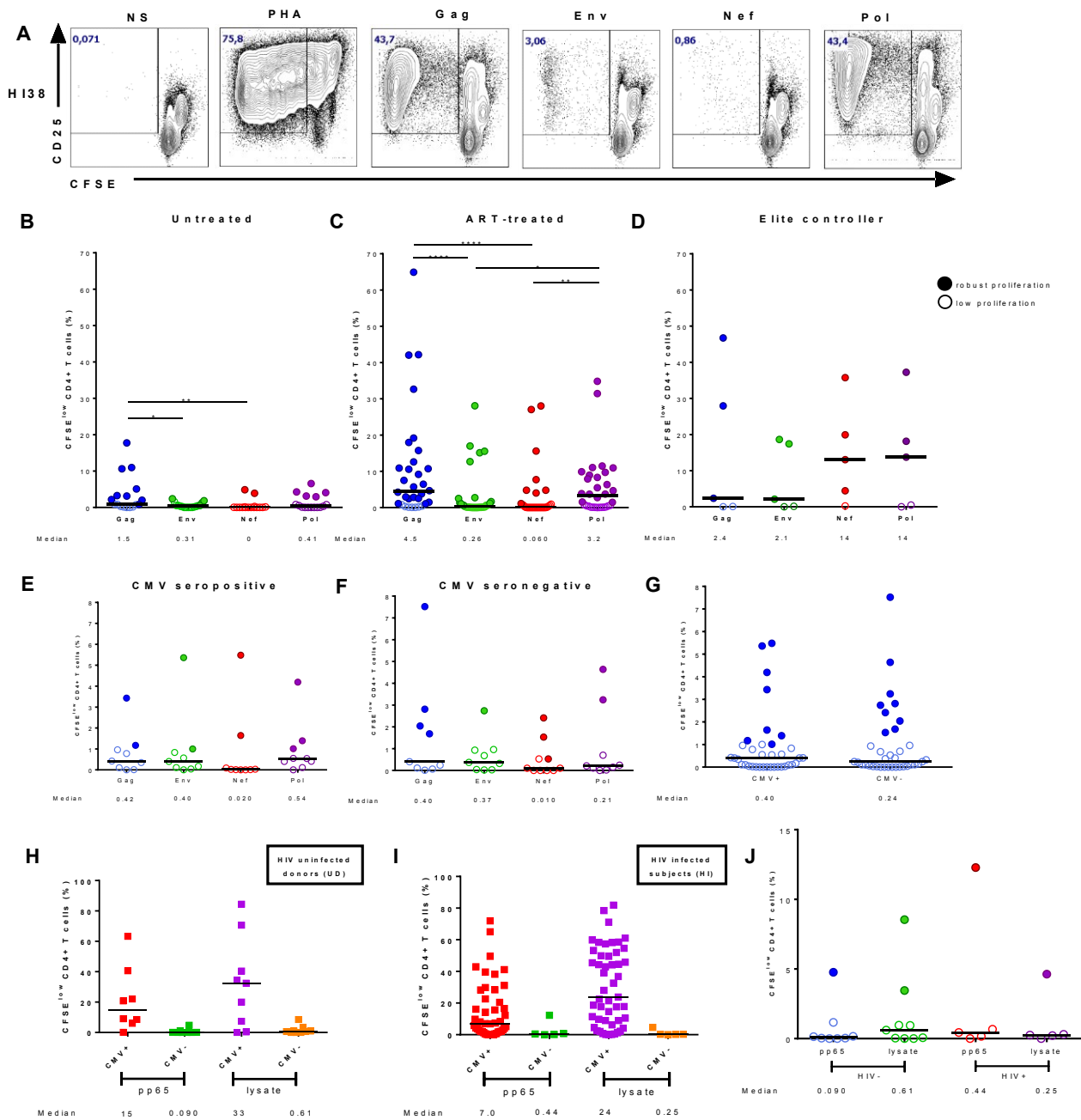
Peptides that show a response for CD40L, TNF $\alpha$  and/or IFN $\gamma$  were identified for the 3 donors.

The Positivity criteria requires the net response to be higher than the background for the same cytokine (CD40L, TNF $\alpha$  or IFN $\gamma$ ) and to be at least 1%.

\* sequence overlapping with our peptide are shown in bold

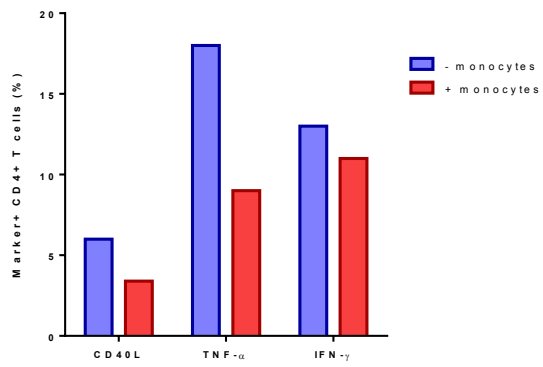
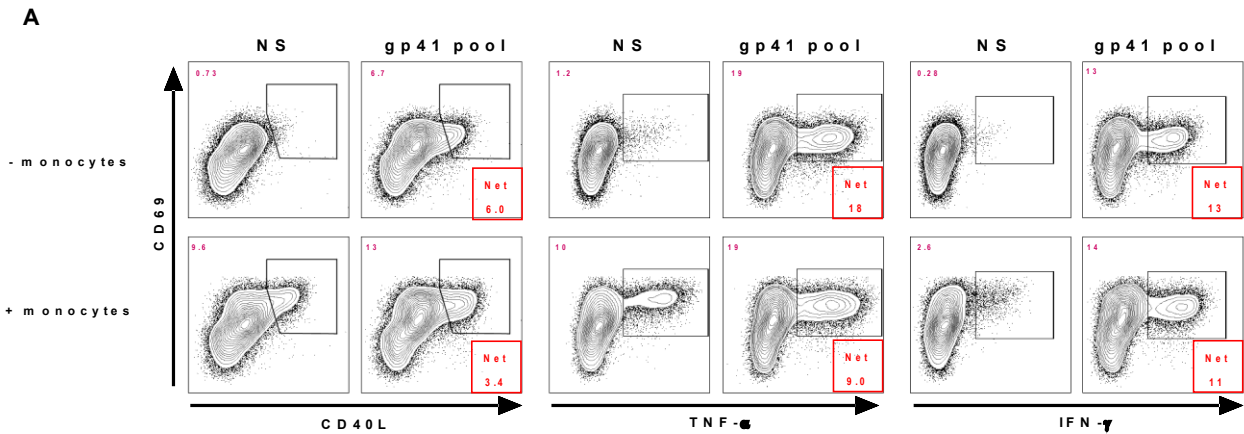


**Supplemental Figure 1. Gating Strategy.** **A)** Gating strategy for the CFSE proliferation assay, starting at the left. The CFSE vs CD25 plot was analysed on the CD4+CD8- population. **B)** Gating strategy for the analysis of cytokine secretion by the cell lines. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD40L and IL-2 were analysed on the CD4+ population.



**Supplemental Figure 2. Prevalence and magnitude of HIV-specific proliferative CD4 T cell responses in chronically infected individuals. A)** CFSE proliferation assay of 7 days from CD8-depleted PBMCs following different stimulations or non-stimulated (NS) for an HIV positive donor. The percentage of CFSE<sup>low</sup> CD25+ cells is indicated in the upper left cadran of each plot. **B)** Magnitudes of proliferative HIV specific CD4 T cell responses for the different stimulations after subtraction of background for HIV untreated donors, **C)** HIV treated donors and **D)** HIV elite controller donors. **E)** Magnitudes of proliferative HIV specific CD4 T cell responses in HIV negative donors for the different stimulations after subtraction of background for CMV positive donors and **F)** CMV negative donors. **G)** Magnitudes of proliferative HIV specific CD4 T cell response in HIV negative donors for any of the 4 HIV antigen stimulations after subtraction of background for CMV+ and CMV- HIV negative donors. **H)** Magnitudes of proliferative CMV specific CD4 T cell responses for the different stimulations after subtraction of background for HIV negative donors and **I)** HIV positive donors. **J)** Magnitudes of proliferative CMV specific CD4 T cell responses for the different stimulations after subtraction of background for CMV- donors. A response is considered positive when the net response is above 1% and when the raw data is at least twice that of the NS condition. For each donor, proliferation against PHA was also test and all the donors showed a proliferation.





**Supplemental Figure 3. Enhanced antigen presentation does not improve responsiveness of HIV-specific CD4 T cell lines in infected donors.** Gp41-specific CD4 T cell line was derived from HIV-infected subject H17 and assessed at day 12. **A**) Net responses obtained for each marker in a 6h ICS assay (gp41 concentration: 0.5  $\mu$ g/mL/peptide) with and without monocyte addition at a ratio of 1 monocyte: 5 CD4 T cell for donor H17.

## Discussion

Notre hypothèse suggérait l'existence de lymphocytes T CD4 spécifiques au VIH-1 chez une minorité substantielle de donneurs séronégatifs. Nous avons bel et bien identifié des cellules T CD4 fonctionnelles spécifiques au VIH chez 55% des donneurs VIH négatifs présents dans notre cohorte. Nous avons établi la proportion d'individus séronégatifs arborant de telles cellules spécifiques pour différents antigènes du VIH (Gag, Env, Nef et Pol) à l'aide d'expériences de prolifération de type CFSE. Ce type d'analyse s'avère efficace pour détecter les réponses fonctionnelles à la suite d'une interaction entre le TCR et le complexe comprenant le CMH de classe II et le peptide. Il permet également de détecter de faibles réponses par sa sensibilité. 33% des individus séronégatifs ont démontré des réponses nettes > 1% contre l'antigène Gag. Les magnitudes provenant des réponses des donneurs VIH négatifs étant plus faibles, elles engendrent un plus faible pourcentage de réponse proliférative robuste chez les individus VIH négatifs. Il est important de noter que, malgré ces différences, la proportion de réponse proliférative robuste est similaire entre les deux groupes dans le cas de la protéine Env du VIH. La proportion de donneurs VIH séropositifs montrant une prolifération robuste en réponse à l'antigène Env est de 31%, ce qui est relativement près de celle observée chez les donneurs VIH négatifs (17%). Ceci est comparable à l'étude vaccinale RV144 où la lymphoprolifération contre l'antigène Env est de 24% (124). Ces hauts taux de prolifération contre Env chez les donneurs non-infectés montrent que des précurseurs de cellules T CD4 spécifiques à l'enveloppe du VIH ne sont pas rares, comme d'autres travaux l'ont également démontré (119). Les deux groupes n'ont pas le même profil d'immunodominance, les quatre antigènes testés sont reconnus en proportion similaire par les

sujets VIH négatifs avec une légère immunodominance pour Gag, tandis que chez les sujets VIH positifs une immunodominance marquée contre Gag est observée. Cette dominance de Gag est très bien décrite dans la littérature (59, 81, 125). En somme, ces résultats de prolifération CFSE concordent avec les résultats obtenus par l'utilisation de tétramères de classe II étant normalement employée (86, 119). De plus, cette méthode moins coûteuse permet l'analyse d'un plus grand nombre de donneurs, car elle n'est pas limitée par la disponibilité des tétramères de classe II pour des antigènes de leucocytes humains (HLA) précis.

Nous avons par la suite investigué si ces réponses de la part des cellules T CD4 spécifique au VIH étaient détectables par l'augmentation de la production de cytokines à l'aide d'un marquage intracellulaire. Les cytokines communément utilisées dans le suivi des individus infectés par le VIH et les personnes ayant reçu un vaccin candidat contre le VIH ont été utilisées. Il s'agit de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , du CD40L et de l'IL-2. Seulement de très faibles productions de ces cytokines ont pu être observées chez une minorité d'individus non-infectés. Ces expérimentations ont été effectuées à l'aide d'une stimulation pour marquage intracellulaire (ICS) de 6h que nous utilisons fréquemment dans le laboratoire. À la suite des résultats, nous pensons que 6h de stimulation n'est peut-être pas assez pour ce type de réponses. Puisqu'il s'agit de réponses provenant de réactions croisées, et donc de plus faible affinité, une étude de cinétique devra être effectuée afin de déterminer la durée optimale pour ce type de réponses. D'autres membres du laboratoire ont mis au point un protocole comprenant une stimulation de 18h. Des essais pour ce protocole ont démontré une meilleure détection des réponses de faible magnitude comparativement au marquage ICS. Ce protocole permet l'identification des réponses immunitaires par l'observation de l'augmentation de

l'expression de marqueurs d'activation cellulaire à la surface des cellules. Cette stimulation de 18h comprend l'analyse du CD69, du CD40L, du OX40 et du CD25, et pourrait laisser plus de temps pour le développement de la réponse s'il y en a une. Les réponses seront analysées selon la fréquence de cellules CD69+CD40L+ et de cellules OX40+CD25+. Contrairement à la stimulation ICS de 6h, dans ce protocole, le CD40L est marqué à la surface des cellules, puisqu'un anticorps liant le CD40 bloque l'interaction de ce dernier avec le CD40L et empêche ainsi son internalisation dans la cellule.

Nous avons également démontré par la production de CD40L et de TNF- $\alpha$  que ces cellules T CD4 sont spécifiques à l'antigène pour lequel elles ont été conditionnées. Nous nous sommes concentrés davantage sur la génération de lignées cellulaires spécifiques à la protéine Gp41 de l'enveloppe du VIH, car plusieurs anticorps neutralisants ont pour cible cette protéine. Les cellules T CD4 reconnaissant spécifiquement la protéine Gp41 sont donc intéressantes à étudier en vue du développement d'un vaccin, puisque ce sont elles qui vont procurer l'aide nécessaire aux cellules B pour le développement des anticorps. Les cellules T possèdent également une plus grande affinité pour cette sous-unité de l'enveloppe, et donc la spécificité en est meilleure.

Parmis nos hypothèses, nous avons ensuite postulé que les réponses spécifiques au VIH chez les donneurs séronégatifs étaient générées en réaction à d'autres agents pathogènes, présentant une réactivité croisée avec les protéines du VIH, mais présentant des différences fonctionnelles significatives avec celles de patients infectés. Notre théorie sur le sujet est que ces réponses sont des réponses de type mémoire. Cela reste cependant à être confirmé à l'aide d'une expérience de tri cellulaire. La génération de lignées cellulaires, provenant de sujets VIH positifs et négatifs, ainsi qu'un marquage de type ICS, nous a permis de comparer le

profil fonctionnel des cellules des deux groupes. En analysant le profil d'expression de cytokines des cellules spécifiques au VIH, nous avons remarqué que la majorité des cellules antigènes spécifiques pour chaque donneur VIH séronégatif était soit simple positive pour CD40L, soit TNF- $\alpha$ . Une proportion de cellules TNF- $\alpha$ +CD40L+ était également présente. L'observation la plus importante émanant de ces résultats est la faible production d'IFN- $\gamma$ , autant chez les cellules T CD4 simples positives que chez les cellules doubles positives IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ + ou IFN- $\gamma$ +CD40L+ spécifiques au VIH chez les donneurs séronégatifs. Les cellules triples positives (IFN- $\gamma$ +TNF- $\alpha$ +CD40L+) ne sont pas présentes en grand nombre non plus. Cette observation a également été notée par un groupe de chercheurs ayant effectué une étude sur le vaccin MVA-B contre le VIH. Chez les individus vaccinés, lors de la stimulation des cellules, celles produisant une cytokine prévalent sur celles possédant deux fonctions ou plus (4).

La génération d'une lignée cellulaire spécifique à la protéine pp65 du cytomégalo virus (CMVpp65), à partir d'un individu sain CMV séronégatif, a permis de démontrer que le profil montrant une faible production d'IFN- $\gamma$  s'applique à toutes cellules spécifiques pour un virus donné retrouvées chez les donneurs non-infectés par ce même virus. La génération de lignées cellulaires CMVpp65 nous a également permis d'identifier une différence fonctionnelle majeure : les cellules T CD4 spécifiques pour un virus chez des individus séropositifs présentent une meilleure polyfonctionnalité représentée par l'augmentation du nombre de cellules triples positives. Nous avons également noté une augmentation des proportions de cellules produisant l'IFN- $\gamma$ , que ce soit seul ou en coexpression avec TNF- $\alpha$  ou CD40L. Le choix des anticorps utilisés pour le marquage ICS nous a permis d'observer les réponses de type Th1 des cellules T CD4. Les profils de sécrétion de cytokines par les cellules T CD4 des

lignées cellulaires provenant de donneurs VIH négatifs et positifs seront analysés prochainement plus en profondeur avec la technique du Luminex afin de déterminer si ces cellules ont d'autres fonctions pouvant correspondre à un autre sous-type de différenciation de cellules T CD4 auxiliaires. La production des cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 sera entre autres analysée afin d'investiguer la présence de cellules T CD4 Th2. Cette analyse nous donnera plus d'informations sur le type de cellules composant les cellules spécifiques au VIH chez les sujets séronégatifs. Il sera intéressant de voir comment l'expression de ces cytokines chez les donneurs VIH- varie en la comparant à celle des donneurs VIH+. Chez les gens infectés par le VIH, on note une diminution de la production des cytokines Th1, particulièrement l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , ainsi qu'une augmentation de la production des cytokines Th2, dont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 (127). Les réponses CMVpp65 pourraient également être analysées, chez les donneurs infectés par le VIH, afin d'observer si le déséquilibre entre la production de cytokines Th1 et Th2 est réservé aux réponses contre le VIH ou bien si toutes les réponses sont affectées lors d'une infection par le VIH.

Avec les observations effectuées sur les différences entre les profils fonctionnels des donneurs VIH positifs et négatifs, nous nous sommes demandé si leurs affinités fonctionnelles différaient également. Nous avons décidé d'investiguer cet aspect, car il pourrait avoir un impact dans l'élaboration d'un vaccin contre le VIH, puisque le seuil d'activation des cellules T CD4 spécifiques au VIH a un rôle à jouer dans l'habilité des cellules à répondre aux antigènes du VIH. Les courbes de dose-réponse pour l'antigène gp41 ont démontré qu'il existe une variabilité au niveau de l'affinité pour cette protéine chez les sujets séronégatifs par le calcul des valeurs EC50s pour les trois cytokines (TNF- $\alpha$ , CD40L et IFN- $\gamma$ ). Le donneur UD1 a démontré que l'affinité des cellules T CD4 spécifiques au VIH pouvait se rapprocher très

près de celle retrouvée chez un donneur infecté par le VIH. Cela indique que les personnes non-infectées par le VIH sont capable de répondre à des doses physiologiques d'antigènes du VIH *in vivo*.

Au cours des expérimentations, nous avons eu vent que la spécificité des lignées cellulaires pouvait être augmentée par l'ajout de CPAs fraîches au moment de la stimulation, puisqu'une présentation des antigènes plus efficace serait offerte aux cellules T CD4. Nous avons testé trois populations différentes de CPA, soit les cellules B, les monocytes et des PBMCs desquels nous avons enlevé les cellules CD3 positives. L'addition de monocytes préalablement pulsés s'est avérée être la population augmentant le plus la spécificité des lignées cellulaires. Au départ, les cultures de lignées cellulaires contenaient des CPAs ayant les capacités d'effectuer la présentation des antigènes de manière efficace, mais après 12 jours de culture, elles n'ont plus la même efficacité, car elles sont épuisées ou elles meurent. Cette technique montre toutefois une augmentation de la spécificité plus apparente pour les lignées cellulaires ayant de petites réponses lors de la stimulation sans monocyte. L'addition de CPAs fraîches peut pallier au manque d'affinité pour l'antigène, ce qui suggère une plus grande dépendance aux molécules de costimulation. Un inconvénient de cette technique est qu'elle augmente le bruit de fond. Malgré cela, les réponses nettes observées dans les conditions stimulées sont plus grandes que celles observées lors d'une stimulation sans monocyte, ce pourquoi nous avons utilisé cette technique pour la cartographie d'épitopes. L'augmentation du bruit de fond crée plus de problèmes chez les donneurs VIH positifs. Chez ces donneurs, les réponses contre le VIH sont de hautes affinités et les cellules T ne nécessitent pas une présentation d'antigène parfaite pour produire une réponse. C'est pourquoi les magnitudes des réponses contre les antigènes du VIH chez les individus séropositifs sans ajout de monocytes

sont plus élevées. L'ajout de monocytes pulsés aux lignées cellulaires VIH positives ne fait donc que réduire les réponses nettes en augmentant le bruit de fond. Pour remédier à ce problème, nous aurions pu essayer d'analyser les cellules avec un marquage cellulaire de surface seulement. L'addition d'un anticorps bloquant contre CD40 empêche le clivage du CD40L à la surface des cellules T et permet son marquage à la surface des cellules. Lors de son utilisation pour d'autres projets du laboratoire, nous avons remarqué que le bruit de fond pour CD40L est réduit. Pour TNF- $\alpha$ , il existe un inhibiteur de l'enzyme TACE, le «TNF-alpha-processing inhibitor-0» (TAPI-0) (128). TACE est l'enzyme responsable du clivage du TNF- $\alpha$  de la membrane cellulaire pour lui donner sa forme soluble. Nous avons testé ces deux composés dans le but de trier des cellules et le marquage de surface était très beau. L'utilisation de l'anticorps bloquant contre CD40 et du TAPI-0 ne nous permettrait pas d'analyser la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , mais puisque de toute façon elle est minime, un marquage de surface pour TNF- $\alpha$  et CD40L pourrait peut-être s'avérer être une solution.

Les lignées cellulaires ont été générées dans le but d'identifier les peptides immunodominants de la protéine Gp41 chez les donneurs séropositifs et séronégatifs. Nous avons comme hypothèse qu'il y aurait un certain partage entre les peptides dominants chez les donneurs VIH négatifs et positifs, puisque les résultats obtenus à l'aide des lignées cellulaires montrant que les sujets VIH négatifs possèdent des cellules spécifiques capables de reconnaître les antigènes du VIH par des réactions croisées. Cette hypothèse s'est avérée être exacte, puisqu'un partage entre les peptides identifiés chez notre donneur VIH séropositif et nos donneurs séronégatifs est observé, ce qui confirme la présence de réactions croisées chez les sujets non-infectés. Nous avons identifié un peu plus de peptides immunodominants qu'un groupe de recherche qui a effectué une étude similaire en utilisant des lignées de cellules T



CD4 pulsées à l'aide de cellules dendritiques dérivées de monocytes. Dans leurs expériences, ils ont identifié entre 2 et 9 peptides individuels donnant un résultat positif dans les analyses d'Elispot pour IFN- $\gamma$  (93). De notre côté, nous avons identifié 12 peptides immunodominants chez le donneur VIH négatif UD1 et 5 chez le donneur UD3. Notre lignée cellulaire générée à partir d'un donneur VIH positif (HI7) a permis l'identification d'un plus grand nombre, soit 15 peptides immunodominants. Cependant, les peptides individuels utilisés par l'autre groupe de recherche couvrent toute la séquence consensus du clade B du VIH, tandis que notre ensemble de peptides couvre seulement la protéine Gp41 du VIH. Les deux donneurs VIH négatifs ne montrent pas une dominance pour exactement les mêmes peptides, mais cela est en accord avec le concept d'une immunité hétérologue. Ce concept veut que le répertoire immunitaire soit altéré par chaque infection qu'un individu acquiert au long de sa vie. Cela affecte donc les réponses produites contre les infections à venir. Il a été démontré notamment qu'une infection par un virus hétérologue à un virus précédemment rencontré pouvait induire une réponse immunodominante contre un épitope ayant une réactivité croisée avec ces deux virus. Cependant, cet épitope ne serait pas immunodominant sans l'infection par le deuxième virus (113).

Nous avons identifié 9 nouveaux peptides provoquant une réponse positive chez les donneurs VIH négatifs, puisqu'ils ne sont pas reportés dans la littérature et la banque de données de «Los Alamos National Laboratory». Ces peptides sont les peptides 125 (AKRRVVQREKRAVGI), 129 (AMFLGFLGAAGSTMG), 177 (RQGYSPFSFQTRLPA), 187 (VDGFLALIWDLRSL), 188 (LALIWDLRSLCLFS), 191 (LFSYHRLRDLLIIVT), 198 (LKYWWNLLQYWSQEL), 199 (WNLLQYWSQELKNSA) et 200 (QYWSQELKNSAVSLL). À noter que le peptide 125 chevauche la protéine Gp120 et Gp41.

Il contient les acides aminés 501 à 515 et la protéine Gp41 débute à la position 512. Il est donc tout à fait possible que le motif reconnu par les cellules se situe dans la partie Gp120 de la protéine de l'enveloppe du VIH plutôt que dans la sous-unité Gp41. De ces 9 peptides, seulement trois (191, 198 et 199) ont également montré une réponse positive chez le donneur VIH positif HI7. Le peptide 199 est le seul peptide ayant montré une réponse positive chez les trois sujets étudiés. La magnitude des réponses produites par le peptide 199 est nettement plus élevée que les autres peptides. Le peptide 198 a également une forte réponse chez l'individu HI7 et une réponse détectable est observée chez l'individu UD3. Puisque les peptides utilisés se chevauchent de 11 acides aminés, nous pouvons affirmer que le motif partagé par ces deux peptides (WNLLQYWSQEL) est un motif immunodominant pour la protéine Gp41 du VIH. Il est donc une cible de choix pour l'élaboration d'un vaccin. Du côté du donneur VIH positif, la majorité des peptides que nous avons identifiés étaient déjà reconnus dans la littérature. Cependant, 5 d'entre eux ne l'étaient pas. Il s'agit des peptides 191, 198 et 199, comme chez les donneurs VIH séronégatifs, mais aussi des peptides 201 (QELKNSAVSLLNATA) et 202 (NSAVSLLNATAIAVA). À la suite de problèmes rencontrés pour la génération des lignées cellulaires, nous n'avons pas eu le temps de faire la cartographie d'épitopes sur un plus grand nombre de donneurs. Il serait intéressant de pouvoir ajouter à l'étude quelques donneurs, autant séronégatifs que séropositifs, afin d'observer si le peptide 199 provoque une réponse positive systématique chez tous les donneurs.

L'optimisation de la technique pour effectuer la cartographie d'épitopes s'est avérée plus longue que prévu. Nous comptions tout d'abord l'effectuer à l'aide d'Elispots. Les Elispots contre l'IFN- $\gamma$  sont généralement utilisés pour ce type d'analyse. Or, dans notre cas, les lignées cellulaires provenant de sujets VIH négatifs ne produisaient pas beaucoup de cette

cytokine. Malgré cela, nous avons tenté l'expérience, mais nous avons également effectué des Elispots contre TNF- $\alpha$  en parallèle. Les Elispots pour l'IFN- $\gamma$  ne permettaient que l'identification de quelques peptides ayant de fortes réponses, tandis que les Elispots contre TNF- $\alpha$  présentaient un haut bruit de fond, ce qui camouflait les réponses positives de certains peptides étant de faible magnitude. Pour utiliser les Elispots, il nous fallait également une lignée ayant une bonne spécificité pour pouvoir observer une réponse. Nous n'avons pas testé l'ajout de monocytes lors d'une stimulation pour les Elispots, mais puisque nous avons noté une augmentation du bruit de fond par marquage intracellulaire et analyse de cytométrie en flux, nous croyons que cet ajout n'aurait fait que masquer davantage les réponses positives. Le marquage intracellulaire nous donnant également la possibilité d'analyser le CD40L, nous avons donc décidé d'utiliser cette méthode pour analyser la cartographie d'épitopes pour la protéine Gp41.

Avec cette cartographie d'épitopes, les peptides identifiés pourront servir au développement d'un vaccin à base d'épitopes. Un vaccin basé sur les épitopes devrait être suffisant pour induire une réponse immunitaire protectrice. La présence de la protéine antigénique complète peut être efficace, mais ne serait pas nécessaire (90). Ce type de vaccin est facile à produire puisqu'il ne requiert que la synthèse de peptides. Cela en fait également un vaccin sécuritaire. Il doit cependant être administré avec un adjuvant, car les peptides seuls ne sont pas très immunogènes (95). On ne retrouve pas encore de vaccins à base d'épitopes sur le marché, mais plusieurs vaccins sont présentement en essais cliniques ou bien en développement, dont un vaccin contre le VIH contenant des peptides de la protéine Gp41(129). Ce vaccin, utilisant un peptide et une protéine recombinante incorporés dans un virosome, a montré une production d'immunoglobulines A (IgA) spécifiques à la protéine

Gp41 dans les tissus vaginaux chez le singe. Ces anticorps ont protégé les singes à la suite de plusieurs expositions de la muqueuse vaginale au virus SIV. Cette stratégie a également été testée chez l'humain et montre la présence d'anticorps IgGs et IgAs dans les muqueuses (130). Puisque l'on peut incorporer plusieurs épitopes dans ce type de vaccin, il est avantageux de choisir au moins un épitope stimulant chaque compartiment du système immunitaire adaptatif (cellules B, cellules T CD4 et cellules T CD8). Une étude réalisée chez des souris et des humains a démontré que ce type de vaccination pouvait induire des réponses de cellules T spécifiques lors d'une deuxième stimulation avec les mêmes peptides que ceux utilisés dans le vaccin. Le vaccin a également permis aux cellules T CD4 spécifique de monter une réponse lors d'une stimulation avec la protéine entière. De plus, ces réponses ont pu être observées chez des donneurs n'ayant pas les mêmes antigènes HLA (131). Il y aurait donc également la possibilité d'effectuer de la médecine personnalisée pour un vaccin à base d'épitopes. Puisque chaque personne ne répond pas exactement aux mêmes peptides, une cartographie comme celle que nous avons effectuée pourrait être utilisée afin d'identifier les épitopes à inclure dans le vaccin pour chaque individu.

Un groupe de recherche en France a démontré qu'il était possible de transférer des TCRs spécifiques à un épitope de Gag dans les cellules T CD4 de donneurs sains. Les cellules transfectées sont par la suite capables d'induire une réponse à la suite d'une stimulation par l'antigène spécifique, et ce, sans être restreintes à un seul allèle HLA-DR (132). Le transfert des gènes codant pour le TCR est une technique prometteuse qui a fait ses preuves en essais cliniques chez des patients présentant des tumeurs malignes métastatiques (133). L'identification de TCRs reconnaissant spécifiquement les peptides identifiés ci-haut, particulièrement pour le peptide 199, pourrait s'avérer utile pour procurer une immunité

préventive chez les individus non-infectés. En combinant cette technique à un vaccin, il sera possible de stimuler les cellules T CD4 ayant reçu un TCR et ainsi, il y aura une expansion de ces cellules et la création de cellules mémoires. Cette technique peut également être appliquée aux cellules T CD8. Les cellules T CD8 possédant un TCR de cellules T CD4 pourront offrir une réponse face aux antigènes restreints au CMH de classe II. Ceci pourrait se montrer efficace pour contrôler l'infection chez un individu présentant un bas taux de cellules T CD4.

Un autre aspect qui serait intéressant d'explorer est le phénotype des cellules spécifiques au VIH que nous avons identifiées chez les donneurs séronégatifs. Une légère modification du panel d'anticorps pour les analyses de cytométrie en flux permettrait d'observer la proportion de cellules effectrices ( $T_{EFF}$ ), de cellules centrales mémoires ( $T_{CM}$ ) et de cellules mémoires effectrices ( $T_{EM}$ ). L'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 pourraient être remplacés par les marqueurs CD45RA et CCR7. CD62L est parfois utilisé pour identifier les cellules naïves et mémoires centrales, mais puisque nous travaillons avec des cellules ayant été congelées, l'expression de CD62L est réduite. CD27 serait par contre un autre marqueur pouvant être utilisé. Les cytokines TNF- $\alpha$  et CD40L servirait à l'identification des cellules antigènes spécifiques. En principe, il ne devrait pas y avoir de cellules doubles positives pour CD45RA+CCR7+ dans la population de cellules antigènes spécifiques, car il s'agit du phénotype pour les cellules naïves. Il serait également intéressant de trier les cellules T CD4 naïves, et les cellules mémoires et de refaire les expériences de prolifération CFSE afin d'observer si les cellules spécifiques au VIH proviennent de l'expansion des cellules naïves ou bien de la réactivation des cellules mémoires. À ce sujet, un groupe de recherche a effectué une expérience semblable en cartographiant le génome complet du clade C du VIH-1 pour les différents sous-types de cellules T CD4 (naïves,  $T_{EM}$  et  $T_{EFF}$ ). Ils ont comparé la fréquence des

cellules T CD4 spécifiques au VIH à la fréquence de cellules T spécifiques pour l'anatoxine tétanique (TT). Chez les cellules naïves, les fréquences sont les mêmes, mais pour les deux types de cellules mémoires, celles étant spécifiques au VIH sont présentes en plus petite quantité. Cela suggère encore une fois que ces cellules dérivent de réactions croisées (119). Un autre groupe a également identifié des cellules T CD4 mémoires spécifiques au VIH chez des individus non-infectés. Ils ont démontré que ces cellules étaient capables de produire des cytokines rapidement et que la population tendait à être plus oligoclonale, comme le sont les cellules mémoires (86).

## **Conclusion**

Des cellules T CD4 spécifiques au VIH existent bel et bien en proportion significative chez les donneurs séronégatifs. Ces cellules produisent des réponses robustes dominées par la sécrétion de TNF- $\alpha$  et CD40L. Nos résultats suggèrent que la protéine Gp41 est une protéine immunodominante concernant les réponses des cellules T CD4 des donneurs VIH négatifs, puisque la cartographie d'épitopes pour cette protéine a identifié plusieurs peptides individuels reconnus par les cellules T CD4. Ces résultats devront être confirmés sur un nombre de sujets plus important. Ces cellules préexistantes pourraient avoir un rôle important à jouer dans l'élaboration des réponses immunitaires durant l'infection par le VIH et contribuer à leurs variabilités, ou bien influencer la qualité, la magnitude et la spécificité des réponses générées par un vaccin. Les résultats de cette étude peuvent être intéressants pour la génération d'un vaccin contre le VIH puisqu'ils indiquent des épitopes immunodominants qui pourraient être

incorporés dans un vaccin. Ces épitopes pourraient également être exploités pour la génération de TCRs destinés à la transfection dans les cellules T afin de procurer une immunité cellulaire.

Pour les études futures, une analyse des marqueurs induits par l'activation sur les cellules T CD4 spécifiques au VIH fera un bon complément à l'étude. L'expression des marqueurs d'activation CD69, CD40L, CD25 et Ox40 sera analysée directement *ex vivo*, ce qui permettra d'observer s'il y a une corrélation avec les résultats de prolifération CFSE ou non. Concernant les expériences de prolifération CFSE, il a été prévu de répéter ces expériences avec le pool de peptide correspondant à la protéine gp41 puisque la majorité des lignées cellulaires ont été générées avec cet antigène. Une analyse de prolifération CFSE est également prévue sur des populations triées selon leur statut de différenciation, c'est-à-dire les cellules naïves, les cellules mémoires centrales, les cellules effectrices et les cellules mémoires effectrices. Cela permettra de confirmer que les cellules répondant aux antigènes du VIH chez les sujets non-infectés sont des cellules de type mémoire. Pour finir, il serait intéressant d'explorer si la pré-immunisation engendrée par les cellules T CD4 spécifiques au VIH préexistantes est capable de prédire certaines caractéristiques qu'aura l'immunité auxiliaire produite par un vaccin candidat.

## Bibliographie

1. Gelmann EP, Popovic M, Blayney D, Masur H, Sidhu G, Stahl RE, et al. Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS. *Science*. 1983;220(4599):862-5. Epub 1983/05/20.
2. Broder S, Gallo RC. A Pathogenic Retrovirus (HTLV-III) Linked to AIDS. *New Engl J Med*. 1984;311(20):1292-7.
3. ONUSIDA. Le sida en chiffres 2015 Genève, Suisse. [modifié le; cité le 13 juin 2016]. Disponible: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/AIDS\\_by\\_the\\_numbers\\_2015\\_fr.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_fr.pdf)
4. Gomez CE, Najera JL, Perdiguero B, Garcia-Arriaza J, Sorzano CO, Jimenez V, et al. The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J Virol*. 2011;85(21):11468-78. Epub 2011/08/26.
5. Makedonas G, Betts MR. Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(3):209-19. Epub 2006/08/26.
6. Canada Gd. Le VIH/SIDA. [modifié le; cité le 11 mai 2016]. Disponible: [http://www.international.gc.ca/development-developpement/priorities-priorites/health-sante/hiv\\_aids-vih\\_sida.aspx?lang=fra](http://www.international.gc.ca/development-developpement/priorities-priorites/health-sante/hiv_aids-vih_sida.aspx?lang=fra)
7. Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, Tanuri A, Delgado-Canedo A, Bonamino MH. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *J Transl Med*. 2016;14(1):288. Epub 2016/10/13.
8. D'Arc M, Ayoub A, Esteban A, Learn GH, Boue V, Liegeois F, et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(11):E1343-52.
9. Foley BT, Leitner T, Paraskevis D, Peeters M. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016. Epub 2016/10/30.
10. Feng Gao, Elizabeth Bailes, David L. Robertson, Yalu Chen, Cynthia M. Rodenburg, Scott F. Michael, et al. Origin of the HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397:436-41.
11. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012;18(3):182-92.
12. Basu VP, Song M, Gao L, Rigby ST, Hanson MN, Bambara RA. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res*. 2008;134(1-2):19-38. Epub 2008/02/19.
13. Gentile M, Adrian T, Scheidler A, Ewald M, Dianzani F, Pauli G, et al. Determination of the size of HIV using adenovirus type 2 as an internal length marker. *J Virol Methods*. 1994;48(1):43-52. Epub 1994/06/01.
14. Dev J, Park D, Fu Q, Chen J, Ha HJ, Ghantous F, et al. Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike. *Science*. 2016;353(6295):172-5. Epub 2016/06/25.
15. Dolcetti R, Giagulli C, He W, Selleri M, Caccuri F, Eyzaguirre LM, et al. Role of HIV-1 matrix protein p17 variants in lymphoma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(46):14331-6. Epub 2015/11/19.



16. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*. 2010;7:96. Epub 2010/11/19.
17. Belfetmi A, Zargarian L, Tisne C, Sleiman D, Morellet N, Lescop E, et al. Insights into the mechanisms of RNA secondary structure destabilization by the HIV-1 nucleocapsid protein. *RNA*. 2016;22(4):506-17. Epub 2016/01/31.
18. Georgiev VS. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH: Volume 2: Impact on Global Health. USA: Springer Science & Business Media; 2009.
19. Bell NM, Lever AM. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol*. 2013;21(3):136-44. Epub 2012/12/26.
20. Bosch V, Pawlita M. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *J Virol*. 1990;64(5):2337-44. Epub 1990/05/01.
21. Li G, De Clercq E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):679-731. Epub 2016/07/01.
22. Miyatake H, Sanjoh A, Murakami T, Murakami H, Matsuda G, Hagiwara K, et al. Molecular Mechanism of HIV-1 Vpr for Binding to Importin-alpha. *J Mol Biol*. 2016;428(13):2744-57. Epub 2016/05/18.
23. Qu D, Li C, Sang F, Li Q, Jiang ZQ, Xu LR, et al. The variances of Sp1 and NF-kappaB elements correlate with the greater capacity of Chinese HIV-1 B'-LTR for driving gene expression. *Sci Rep*. 2016;6:34532. Epub 2016/10/05.
24. Center RJ, Leapman RD, Lebowitz J, Arthur LO, Earl PL, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol*. 2002;76(15):7863-7. Epub 2002/07/05.
25. Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*. 2000;151(2):413-23. Epub 2000/10/19.
26. 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. Epub 1998/01/24.
27. Lillehoj EP, Salazar FH, Mervis RJ, Raum MG, Chan HW, Ahmad N, et al. Purification and structural characterization of the putative gag-pol protease of human immunodeficiency virus. *J Virol*. 1988;62(8):3053-8. Epub 1988/08/01.
28. Votteler J, Neumann L, Hahn S, Hahn F, Rauch P, Schmidt K, et al. Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly. *Retrovirology*. 2011;8:11. Epub 2011/02/18.
29. Mansky LM. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol*. 1998;79 ( Pt 6):1337-45. Epub 1998/06/20.
30. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol*. 2010;84(19):9864-78. Epub 2010/07/28.
31. Cuevas JM, Geller R, Garijo R, Lopez-Aldeguer J, Sanjuan R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol*. 2015;13(9):e1002251. Epub 2015/09/17.
32. Strebel K. HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr Opin Virol*. 2013;3(6):692-9. Epub 2013/11/20.
33. Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*. 2008;3(6):388-98. Epub 2008/06/11.
34. Wilhelm E, Doyle MC, Nzaramba I, Magdzinski A, Dumais N, Bell B. CTGC motifs within the HIV core promoter specify Tat-responsive pre-initiation complexes. *Retrovirology*. 2012;9:62. Epub 2012/07/28.

35. Wilhelm E, Bell B. Selective recognition of viral promoters by host cell transcription complexes: challenges and opportunities to control latency. *Curr Opin Virol.* 2013;3(4):380-6. Epub 2013/07/06.
36. Cochrane A, Kramer R, Ruben S, Levine J, Rosen CA. The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology.* 1989;171(1):264-6. Epub 1989/07/01.
37. Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J Virol.* 1996;70(4):2350-9. Epub 1996/04/01.
38. Yang X, Goncalves J, Gabuzda D. Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *J Biol Chem.* 1996;271(17):10121-9. Epub 1996/04/26.
39. Miyagi E, Schwartzkopff F, Plishka R, Buckler-White A, Clouse KA, Strebel K. APOBEC3G-independent reduction in virion infectivity during long-term HIV-1 replication in terminally differentiated macrophages. *Virology.* 2008;379(2):266-74. Epub 2008/08/05.
40. Reddy K, Ooms M, Letko M, Garrett N, Simon V, Ndung'u T. Functional characterization of Vif proteins from HIV-1 infected patients with different APOBEC3G haplotypes. *AIDS.* 2016. Epub 2016/04/12.
41. Park SY, Waheed AA, Zhang ZR, Freed EO, Bonifacino JS. HIV-1 Vpu accessory protein induces caspase-mediated cleavage of IRF3 transcription factor. *J Biol Chem.* 2014;289(51):35102-10. Epub 2014/10/30.
42. Dube M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Binette J, Mercier J, Chiasson A, et al. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000856. Epub 2010/04/14.
43. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, et al. Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007;23(3):391-7. Epub 2007/04/07.
44. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med.* 2002;8(7):673-80. Epub 2002/07/02.
45. Edwards S, Stucki H, Bader J, Vidal V, Kaiser R, Battegay M, et al. A diagnostic HIV-1 tropism system based on sequence relatedness. *J Clin Microbiol.* 2015;53(2):597-610. Epub 2014/12/17.
46. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:657-700. Epub 1999/06/08.
47. Jiang X, Jia Q, Lu L, Yu F, Zheng J, Shi W, et al. A novel bispecific peptide HIV-1 fusion inhibitor targeting the N-terminal heptad repeat and fusion peptide domains in gp41. *Amino Acids.* 2016;48(12):2867-73. Epub 2016/09/16.
48. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb perspectives in medicine.* 2012.
49. Comas-Garcia M, Davis SR, Rein A. On the Selective Packaging of Genomic RNA by HIV-1. *Viruses.* 2016;8(9). Epub 2016/09/15.
50. Hellmund C, Lever AM. Coordination of Genomic RNA Packaging with Viral Assembly in HIV-1. *Viruses.* 2016;8(7). Epub 2016/07/20.
51. Landovitz RJ, Tran TTT, Cohn SE, Ofotokun I, Godfrey C, Kuritzkes DR, et al. HIV Transmission Risk Behavior in a Cohort of HIV-Infected Treatment-Naïve Men and Women in the United States. *AIDS Behav.* 2016:1-13.

52. Nadol P, Tran H, Hammett T, Phan S, Nguyen D, Kaldor J, et al. High HIV Prevalence and Associated Risk Factors Among Female Sexual Partners of Male Injection Drug Users (MWID) in Ho Chi Minh City, Vietnam. *AIDS Behav.* 2016;20(2):395-404.
53. Dolisi G. Quelques données sur la physiopathologie du SIDA: 2016. [modifié le; cité le 13 juin 2016]. Disponible: [http://www.bio-top.net/Physiopathologie/sida\\_evolution.htm](http://www.bio-top.net/Physiopathologie/sida_evolution.htm)
54. Chevalier MF, Didier C, Girard PM, Manea ME, Campa P, Barre-Sinoussi F, et al. CD4 T-Cell Responses in Primary HIV Infection: Interrelationship with Immune Activation and Virus Burden. *Front Immunol.* 2016;7:395. Epub 2016/10/18.
55. Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:265-304. Epub 2003/01/14.
56. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature.* 2005;434(7037):1148-52. Epub 2005/03/29.
57. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005;434(7037):1093-7. Epub 2005/03/29.
58. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity.* 2007;27(3):406-16. Epub 2007/09/26.
59. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, et al. Comprehensive Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD4 Responses Reveals Marked Immunodominance of gag and nef and the Presence of Broadly Recognized Peptides. *J Virol.* 2004;78(9):4463-77.
60. Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2009;206(6):1253-72. Epub 2009/06/03.
61. Josefina J, Card AA, Alana Conner, Diana Dull Akers, Julie Solomon, Ralph J, DiClemente. *The complete HIV/AIDS teaching Kit.* USA: Springer Publishing Company; 2007.
62. Eholie SP, Badje A, Kouame GM, N'Takpe J B, Moh R, Danel C, et al. Antiretroviral treatment regardless of CD4 count: the universal answer to a contextual question. *AIDS Res Ther.* 2016;13:27. Epub 2016/07/28.
63. Virgin HW, Walker BD. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature.* 2010;464(7286):224-31.
64. Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Res Ther.* 2007;4:11. Epub 2007/05/16.
65. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol.* 1996;50:825-54. Epub 1996/01/01.
66. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med.* 1996;334(7):426-31. Epub 1996/02/15.
67. Porichis F, Kaufmann DE. Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2012;9(1):81-90. Epub 2011/12/27.

68. d'Ettorre G, Ceccarelli G, Pavone P, Vittozzi P, De Girolamo G, Schietroma I, et al. What happens to cardiovascular system behind the undetectable level of HIV viremia? *AIDS Res Ther.* 2016;13:21. Epub 2016/04/30.
69. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006;12(12):1365-71. Epub 2006/11/23.
70. Brenner BG, Wainberg MA. Clinical benefit of dolutegravir in HIV-1 management related to the high genetic barrier to drug resistance. *Virus Res.* 2016. Epub 2016/07/17.
71. Musso CG, Belloso WH, Glassock RJ. Water, electrolytes, and acid-base alterations in human immunodeficiency virus infected patients. *World journal of nephrology.* 2016;5(1):33-42. Epub 2016/01/21.
72. Lalloo UG, Pillay S, Mngqibisa R, Abdool-Gaffar S, Ambaram A. HIV and COPD: a conspiracy of risk factors. *Respirology.* 2016. Epub 2016/05/31.
73. Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Pecorini S, Bacca V, et al. Aging and inflammation in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 2016. Epub 2016/05/21.
74. Bhatia NS, Chow FC. Neurologic Complications in Treated HIV-1 Infection. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2016;16(7):62. Epub 2016/05/14.
75. l'Actuel Cm. Santé sexuelle: Vivre avec le VIH. [modifié le; cité le 3 août 2016]. Disponible: [http://cliniquelactuel.com/vivre\\_avec\\_VIH\\_test\\_cd4\\_clinique-medicale-l-actuel.html](http://cliniquelactuel.com/vivre_avec_VIH_test_cd4_clinique-medicale-l-actuel.html)
76. Nakagawa F, May M, Phillips A. Life expectancy living with HIV: recent estimates and future implications. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(1):17-25. Epub 2012/12/12.
77. Cihlar T, Fordyce M. Current status and prospects of HIV treatment. *Curr Opin Virol.* 2016;18:50-6. Epub 2016/03/30.
78. Sheth AN, Rolle CP, Gandhi M. HIV pre-exposure prophylaxis for women. *Journal of virus eradication.* 2016;2(3):149-55. Epub 2016/08/03.
79. Rojas Castro D, Quatremere G, Sagaon-Teyssier L, Le Gall JM, Preau M, Suzan-Monti M, et al. Informal pre-exposure prophylaxis use in France: results from the Flash PrEP survey (2014). *HIV Med.* 2016. Epub 2016/08/02.
80. Elbirt D, Mahlab-Guri K, Bezalel-Rosenberg S, Asher I, Sthoeger Z. Pre-Exposure Prophylaxis as a Method for Prevention of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Isr Med Assoc J.* 2016;18(5):294-8. Epub 2016/07/20.
81. Buggert M, Norstrom MM, Czarnecki C, Tupin E, Luo M, Gyllensten K, et al. Characterization of HIV-specific CD4+ T cell responses against peptides selected with broad population and pathogen coverage. *PLoS One.* 2012;7(7):e39874. Epub 2012/07/14.
82. Riou C, Ganusov VV, Champion S, Mlotshwa M, Liu MK, Whale VE, et al. Distinct kinetics of Gag-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during acute HIV-1 infection. *J Immunol.* 2012;188(5):2198-206. Epub 2012/01/31.
83. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W. A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. 2011:15-27.
84. Su LF, Davis MM. Antiviral memory phenotype T cells in unexposed adults. *Immunol Rev.* 2013;255(1):95-109. Epub 2013/08/21.
85. Nelson RW, Beisang D, Tubo NJ, Dileepan T, Wiesner DL, Nielsen K, et al. T cell receptor cross-reactivity between similar foreign and self peptides influences naive cell population size and autoimmunity. *Immunity.* 2015;42(1):95-107.

86. Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity*. 2013;38(2):373-83.
87. Toor AA, Toor AA, Rahmani M, Manjili MH. On the organization of human T-cell receptor loci: log-periodic distribution of T-cell receptor gene segments. *J R Soc Interface*. 2016;13(114):20150911. Epub 2016/01/15.
88. Smith SN, Wang Y, Baylon JL, Singh NK, Baker BM, Tajkhorshid E, et al. Changing the peptide specificity of a human T-cell receptor by directed evolution. *Nat Commun*. 2014;5:5223. Epub 2014/11/08.
89. Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK. Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev*. 2010;235(1):244-66. Epub 2010/06/12.
90. Servin-Blanco R, Zamora-Alvarado R, Gevorkian G, Manoutcharian K. Antigenic variability: Obstacles on the road to vaccines against traditionally difficult targets. *Hum Vaccin Immunother*. 2016:0. Epub 2016/06/14.
91. Li HM, Hiroi T, Zhang Y, Shi A, Chen G, De S, et al. TCRbeta repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition. *J Leukoc Biol*. 2016;99(3):505-13. Epub 2015/09/24.
92. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*. 1998;19(9):395-404. Epub 1998/09/24.
93. Lubong Sabado R, Kavanagh DG, Kaufmann DE, Fru K, Babcock E, Rosenberg E, et al. In vitro priming recapitulates in vivo HIV-1 specific T cell responses, revealing rapid loss of virus reactive CD4 T cells in acute HIV-1 infection. *PLoS One*. 2009;4(1):e4256. Epub 2009/01/24.
94. Xu Y, Luo C, Qian M, Huang X, Zhu S. MHC2MIL: a novel multiple instance learning based method for MHC-II peptide binding prediction by considering peptide flanking region and residue positions. *BMC Genomics*. 2014;15 Suppl 9:S9. Epub 2014/12/19.
95. Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(5):404-14. Epub 2007/05/03.
96. Eger KA, Unutmaz D. The innate immune system and HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2005;2(1):10-5. Epub 2005/08/11.
97. Shey MS, Maharaj N, Archary D, Ngcapu S, Garrett N, Abdool Karim S, et al. Modulation of Female Genital Tract-Derived Dendritic Cell Migration and Activation in Response to Inflammatory Cytokines and Toll-Like Receptor Agonists. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155668. Epub 2016/05/14.
98. Beignon A-S, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor–viral RNA interactions. *The Journal of Clinical Investigation*. 115(11):3265-75.
99. Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003;91(1):1-12. Epub 2003/01/01.
100. Della Chiesa M, Sivori S, Carlomagno S, Moretta L, Moretta A. Activating KIRs and NKG2C in Viral Infections: Toward NK Cell Memory? *Front Immunol*. 2015;6:573. Epub 2015/12/01.
101. Osterburg AR, Nelson RL, Yaniv BZ, Foot R, Donica WR, Nashu MA, et al. NK cell activating receptor ligand expression in lymphangioliomyomatosis is associated with lung function decline. *JCI insight*. 2016;1(16):e87270. Epub 2016/10/14.

102. Zaunders JJ, Munier ML, Kaufmann DE, Ip S, Grey P, Smith D, et al. Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood*. 2005;106(5):1660-7. Epub 2005/05/21.
103. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature*. 2001;410(6824):106-11. Epub 2001/03/10.
104. Morou A, Palmer BE, Kaufmann DE. Distinctive features of CD4+ T cell dysfunction in chronic viral infections. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014;9(5):446-51. Epub 2014/07/16.
105. Baxter AE, Kaufmann DE. Tumor-necrosis factor is a master of T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2016;17(5):476-8. Epub 2016/04/20.
106. Kaufmann DE, Walker BD. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol*. 2009;182(10):5891-7. Epub 2009/05/06.
107. Williams WB, Liao HX, Moody MA, Kepler TB, Alam SM, Gao F, et al. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science*. 2015;349(6249):aab1253.
108. Overbaugh J, Morris L. The Antibody Response against HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(1):a007039. Epub 2012/02/09.
109. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR. Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):74-84. Epub 2013/02/26.
110. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8. Epub 2002/05/03.
111. De Milito A. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res*. 2004;2(1):11-21. Epub 2004/04/01.
112. de Souza MS, Ratto-Kim S, Chuenarom W, Schuetz A, Chantakulkij S, Nuntapinit B, et al. The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. *J Immunol*. 2012;188(10):5166-76. Epub 2012/04/25.
113. Brehm MA, Pinto AK, Daniels KA, Schneck JP, Welsh RM, Selin LK. T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol*. 2002;3(7):627-34. Epub 2002/06/11.
114. Singh S, Vedi S, Samrat SK, Li W, Kumar R, Agrawal B. Heterologous Immunity between Adenoviruses and Hepatitis C Virus: A New Paradigm in HCV Immunity and Vaccines. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146404. Epub 2016/01/12.
115. Wedemeyer H, Mizukoshi E, Davis AR, Bennink JR, Rehmann B. Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol*. 2001;75(23):11392-400. Epub 2001/11/02.
116. Amir AL, D'Orsogna LJ, Roelen DL, van Loenen MM, Hagedoorn RS, de Boer R, et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood*. 2010;115(15):3146-57. Epub 2010/02/18.
117. Krummey SM, Martinez RJ, Andargachew R, Liu D, Wagener M, Kohlmeier JE, et al. Low-Affinity Memory CD8+ T Cells Mediate Robust Heterologous Immunity. *J Immunol*. 2016;196(6):2838-46. Epub 2016/02/13.

118. Ayres CM, Scott DR, Corcelli SA, Baker BM. Differential utilization of binding loop flexibility in T cell receptor ligand selection and cross-reactivity. *Sci Rep.* 2016;6:25070. Epub 2016/04/28.
119. Champion SL, Brodie TM, Fischer W, Korber BT, Rossetti A, Goonetilleke N, et al. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4(+) T cells in unexposed blood donors. *J Exp Med.* 2014;211(7):1273-80.
120. Kosmrlj A, Read EL, Qi Y, Allen TM, Altfeld M, Deeks SG, et al. Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection. *Nature.* 2010;465(7296):350-4. Epub 2010/05/07.
121. Venturini S, Allicotti G, Zhao Y, Simon R, Burton DR, Pinilla C, et al. Identification of peptides from human pathogens able to cross-activate an HIV-1-gag-specific CD4+ T cell clone. *Eur J Immunol.* 2006;36(1):27-36. Epub 2005/12/03.
122. Musich T, Robert-Guroff M. New developments in an old strategy: heterologous vector primes and envelope protein boosts in HIV vaccine design. *Expert Rev Vaccines.* 2016:1-13. Epub 2016/02/26.
123. Gray GE, Laher F, Lazarus E, Ensoli B, Corey L. Approaches to preventative and therapeutic HIV vaccines. *Curr Opin Virol.* 2016;17:104-9. Epub 2016/03/18.
124. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med.* 2009;361(23):2209-20. Epub 2009/10/22.
125. Gomez CE, Perdiguero B, Garcia-Arriaza J, Cepeda V, Sanchez-Sorzano CO, Mothe B, et al. A Phase I Randomized Therapeutic MVA-B Vaccination Improves the Magnitude and Quality of the T Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Subjects on HAART. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141456.
126. Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, Butera ST, Crotty S, Godzik A, et al. A Blueprint for HIV Vaccine Discovery. *Cell Host Microbe.* 2012;12(4):396-407.
127. Reuter MA, Pombo C, Betts MR. Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012;23(4-5):181-91. Epub 2012/06/30.
128. Haney D, Quigley MF, Asher TE, Ambrozak DR, Gostick E, Price DA, et al. Isolation of viable antigen-specific CD8+ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)-alpha expression. *J Immunol Methods.* 2011;369(1-2):33-41.
129. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity.* 2011;34(2):269-80. Epub 2011/02/15.
130. Leroux-Roels G, Maes C, Clement F, van Engelenburg F, van den Dobbelen M, Adler M, et al. Randomized Phase I: Safety, Immunogenicity and Mucosal Antiviral Activity in Young Healthy Women Vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 Peptide on Virosomes. *PLoS One.* 2013;8(2):e55438. Epub 2013/02/26.
131. Jiang S, Song R, Popov S, Mirshahidi S, Ruprecht RM. Overlapping synthetic peptides as vaccines. *Vaccine.* 2006;24(37-39):6356-65. Epub 2006/06/24.
132. Benati D, Galperin M, Lambotte O, Gras S, Lim A, Mukhopadhyay M, et al. Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *J Clin Invest.* 2016;126(6):2093-108. Epub 2016/04/26.

133. Motozono C, Bridgeman JS, Price DA, Sewell AK, Ueno T. Clonotypically similar hybrid alphabeta T cell receptors can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(3):560-70. Epub 2015/02/28.