



HAL
open science

Reconnaissance de variants d'un épitope viral par des lymphocytes T CD8+ induits par la vaccination de singes rhésus

Sandrine Hulot

► **To cite this version:**

Sandrine Hulot. Reconnaissance de variants d'un épitope viral par des lymphocytes T CD8+ induits par la vaccination de singes rhésus. Virologie. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2010. Français. NNT : 2010CNAM0744 . tel-00598370

HAL Id: tel-00598370

<https://theses.hal.science/tel-00598370>

Submitted on 6 Jun 2011

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

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



THESE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade

de Docteur ès Sciences

Spécialité : Biologie

Reconnaissance de variants d'un épitope viral par des lymphocytes T CD8+ induits par la vaccination de singes rhésus

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2010 par

Sandrine HULOT

Composition du jury

| | |
|-------------------------------------|---|
| Rapporteur : | Pr Brigitte AUTRAN |
| Rapporteur : | Pr Roger LE GRAND |
| Président du jury : | Pr Jean-François ZAGURY |
| Examineur : | Pr Ali SAIB |
| Directeurs de thèse en co-tutelle : | Pr Norman LETVIN (Harvard Medical School) |
| et | Pr Philippe POCHART (CNAM) |

THESE DE DOCTORAT

pour l'obtention du grade

de Docteur ès Sciences

Spécialité : Biologie

Reconnaissance de variants d'un épitope viral par des lymphocytes T CD8+ induits par la vaccination de singes rhésus

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2010 par

Sandrine HULOT

Composition du jury

| | |
|-------------------------------------|---|
| Rapporteur : | Pr Brigitte AUTRAN |
| Rapporteur : | Pr Roger LE GRAND |
| Président du jury : | Pr Jean-François ZAGURY |
| Examineur : | Pr Ali SAIB |
| Directeurs de thèse en co-tutelle : | Pr Norman LETVIN (Harvard Medical School) |
| et | Pr Philippe POCHART (CNAM) |

Mes travaux de recherche ont été réalisés dans la Division of Viral Pathogenesis du Beth Israel Deaconess Medical Center affilié à Harvard Medical School, Boston, MA, USA.



A ma Grand-Mère, Hélène Hulot

Remerciements

Je tiens à remercier les Professeurs Brigitte Autran, Roger LeGrand, Ali Saïb et Jean-François Zagury pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de juger mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements au corps enseignant qui tient un rôle essentiel dans le monde. Je remercie particulièrement les professeurs du CNAM qui cumulent les défis : Non seulement, ils doivent intéresser les auditeurs mais ils doivent aussi les garder éveiller après une longue journée de travail et leur donner envie de retravailler leurs cours alors que les autres se détendent, font la fête....

Je remercie Pr. Philippe Pochart d'avoir accepté de diriger ma thèse à distance et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes recherches à Boston dans la Division of Viral Pathogenesis du Beth Israel Deaconess Medical Center, dirigée par Pr. Norman Letvin.

Je remercie Pr. Norman Letvin, mon Directeur de recherche américain, my mentor. Norm, You hired me as research associate in May 2006 and let me apply to this Ph.D. program few months later. I remember when I arrived in Boston. You said: "Sandrine, Make yourself at home!" ...and few years later, I can say: What a journey! Norm, I want you to know that I enjoy working with you as much as you enjoy playing your preferred clarinet piece. Thank you so much for letting me grow up in our second Family. You are an amazing Mentor. I will be grateful for ever. God bless you, Marion and your Family.

I want to thank all the Harvard Medical School graduate students of the Letvin Lab, and specially Evan Cale. Evan, you taught me most of the techniques I used in my Ph.D. project with so much patience. You are here for everybody, anytime, for work but also to have fun! I remember the meeting with you, Norm and Ed to prepare my first talk in front of the entire division! This brainstorming burnt my four neurons! However, the next day, I felt so good! Evan, Thank you for your understanding each time I was looking for my words because I was tired, I was impressed or just because English is not my first language. You really impress me. You will be an excellent P.I. and mentor. You deserve the Best! Evan, you are not only a coworker, you are my Friend! and If you need something, anytime, just ask me.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Daniele Baudouin, ma première professeur de biologie qui m'a transmis la flamme. Je suis définitivement votre fille adoptive. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour tous les autres élèves qui ont eu la chance d'être dans votre classe.

Je remercie du plus profond de mon coeur Jacques Lauerjat, ancien vice-Président de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI, mon mentor français, et Catherine Blanchet sa femme pour leur soutien et leur confiance durant toutes ces années.

Aussi, je tiens à exprimer ma gratitude à Gillian Buttler Brown qui dirige l'unité mixte de recherche UMR 787 à l'institut de myologie du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris, et Vincent Mouly grâce auxquels j'ai fait mes premiers pas dans la recherche médicale.

Je voudrais remercier la BFTAC, "Boston Family t'a craqué" et particulièrement le plus sage d'entre vous (quoi que) qui partage mon quotidien. Merci de partager les bons moments comme les autres plus difficiles. Many thanks also to my first Americano-Frenchy Family : Meredith, Teresa and Rob, Fred, Rajini and Jehan. Thank you for your support, your love and for the good time we have spent together. I love you guys and I miss you! L'amitié comme l'amour est vraiment quelque chose d'exceptionnel.

Un grand Merci à toi mon Amie Caroline, pour m'avoir soutenue tout au long de ma thèse et particulièrement durant cette période d'écriture. Merci pour ta relecture attentive et critique de ce manuscrit, en collaboration avec Gillou. Je sais que tu as envie d'ouvrir une "tarterie" sur Boylson Street

après ton post-Doc mais tu es toujours d'accord pour faire notre tour du monde en camionnette? Je connais des bons coins maintenant.

Je remercie du plus profond de mon coeur, Dr. Béchir Jarraya auprès duquel j'ai eu l'honneur de travailler au Bloc opératoire de neurochirurgie de la Pitié-Salpêtrière. Tu étais jeune interne et je courrais entre le bloc, le labo de neurogénétique et Jussieu pour ma licence/maîtrise de Bio. Et je te retrouve quelques années plus tard ...sur Charles Street!!!! Tu es quelqu'un d'exceptionnel! Tu cours entre le labo et le bloc mais tu as pris le temps de veiller sur ma maman à l'Hôpital Henri Mondor quand j'étais à 6000Km. Tu es mon ami et mon frère de coeur.

Enfin, je tiens à remercier ma Famille et Belle Famille. Christiane et Jean-Louis, Merci pour votre Amour et votre soutien sans faille malgré les distances. Vous êtes des personnes formidables! By the way, Jamais je n'aurai pensé me retrouver dans une chapelle de Las Vegas...Pour remarier mes beaux Parents : On a bien ri avec Gillou. Finir la soirée au pays des fantomas (Blue man group de son vrai nom) qui cassaient la baraque au Venitian, ça c'était de l'ambiance! Et puis, le petit crochet par le Grand Canyon valait vraiment le coup.

Je tiens à rendre hommage à ma grand-mère qui m'a non seulement soutenue pendant toutes ces années mais aussi appris l'essentiel : Aimer, Aimer ce que l'on fait, croire en soi, en ses rêves et se battre pour les réaliser.

Enfin, Merci à toi Petit Coeur, pour ton soutien au quotidien, pour m'aider à donner le meilleur, et pour me faire découvrir des paradis terrestres... A propos, quand est-ce qu'on retourne barboter avec les Spinner Dolphins de Two Steps, Hawaii?

Merci à tous ceux que j'ai croisés sur mon chemin, famille, amis, patients, médecins, professeurs, qui ont fait de moi celle que je suis aujourd'hui.

Mes travaux de thèse ont été financés par le Center for HIV-AIDS Vaccine Immunology (CHAVI), qui m'a aussi donné généreusement l'opportunité de présenter mes travaux dans des congrès internationaux notamment aux Keystone Symposia, mais aussi au congrès AIDS Vaccine 2009, à Paris!

RESUME

La diversité génétique du virus de l'immunodéficience humaine, le VIH-1 responsable de la pandémie du SIDA, représente un challenge dans le développement d'un vaccin qui doit conférer une protection contre différentes formes du virus pour être efficace.

L'identification de populations de lymphocytes T CD8⁺ (CTL) capables de reconnaître des variants peptidiques d'un épitope est donc une étape importante. Dans le modèle singes rhésus, j'ai montré en utilisant des tétramères spécifiques de 9 variants peptidiques d'un épitope qu'une même population de CTL générés par la vaccination, peut reconnaître l'épitope relatif à l'immunogène et un certain nombre de ses variants provenant de diverses formes du VIH-1. Ces études ont également permis de caractériser les populations de CTL spécifiques de chaque variant de cet épitope en analysant l'expression des différents gènes codant pour la chaîne variable β du TCR ($V\beta$ répertoire) et par un large séquençage des régions complémentaires déterminantes 3 (CDR3) du TCR β .

Ces travaux ont montré qu'une vaccination utilisant la séquence du clade C de l'enveloppe du VIH-1 conduit à des réponses divergentes chez 2 singes rhésus Mamu-A*01⁺. De plus, ces résultats ont mis en évidence que l'usage de certains $V\beta$ permet pas de déterminer le potentiel cross-réactif des CTL. Par ailleurs, une immunisation utilisant des séquences de l'enveloppe du clade B du VIH-1 peut générer des CTL capables de reconnaître un large nombre de variants de l'épitope testé. L'analyse de 8112 séquences CDR3 du TCR β a permis de les caractériser. Cependant, les tests fonctionnels ont démontré que bon nombre de ces variants peptidiques stimulent une production suboptimale de cytokines par les CTL générés après vaccination. Ces résultats démontrent que la reconnaissance de variant peptidiques d'un épitope est nécessaire mais pas suffisante pour protéger contre différentes formes du VIH-1 exprimant ces séquences. L'identification de variants peptidiques capables d'induire une réponse fonctionnelle des CTL pourrait contribuer au développement d'un vaccin efficace contre le VIH-1.

Mots-clés : VIH-1, vaccin, CTL, variants, $V\beta$ répertoire, CDR3

ABSTRACT

The sequence diversity of HIV-1 presents a challenge for the development of an effective vaccine, since such a vaccine must confer protection against diverse forms of the virus.

Identifying CD8⁺ T lymphocytes (CTL) recognizing variants of an epitope sequence is an important step. In the rhesus monkey model, I showed by tetramer binding assays, that the same vaccine elicited CD8⁺ T lymphocyte populations comparably recognize the epitope relative to the immunogen and a number of variant epitope peptides from diverse forms of HIV-1. During my thesis, I also characterized populations of CD8⁺ T lymphocytes specific for each variant of the tested epitope by studying their V β repertoire and by a large sequencing of the complementarity determining region (CDR3) of the TCR β .

These studies showed that a single clade C env immunization generate CTL with differences in the ability to cross-react to variant epitope in monkeys sharing the same MHC class-I molecule. Moreover, the data showed that V β employed by CTL can not predict the capacity of these CTL to recognize epitopes from diverse HIV-1 isolates.

Additionally, I showed that clade B Env immunizations generate populations of CTL recognizing wild type and a number of variant epitope peptides. However, functional assays demonstrate that many of them stimulate suboptimal cytokine production by the vaccine-elicited CTL.

These finding demonstrate that the recognition of variant epitope peptides is necessary but not sufficient to protect against different forms of HIV-1. Identifying variant epitopes inducing functional responses of CTL should contribute to the development of an effective vaccine.

Keywords: HIV-1, Env vaccines, CTL, variant epitope peptide, V β repertoire, CDR3.

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| ADCC | antibody-directed cellular cytotoxicity |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| Ad5 | adénovirus sérotype 5 |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| APC | Cellule Présentatrice de l'Antigène |
| -APC | Allophycocyanine |
| CCR5 | récepteur des α -chimiokine RANTES, MIP1- α et MIP-1 β |
| CD | Cluster de différenciation |
| CDC | Center for Disease Control |
| CDR3 | Complementarity Determining Region 3 |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité aussi appelé HLA |
| CRF | Circulating Recombinant form |
| CTL | Cytotoxic T lymphocyte ou lymphocyte T CD8+ |
| CXCR4 | récepteur de l' α -chimiokine SDF-1 |
| DC | cellule dendritique |
| DC-SIGN | lectine de surface des cellules dendritiques |
| ELISpot | Enzyme Linked Immunoabsorbent Spot assay |
| env | <u>en</u> veloppe (gène codant pour l'enveloppe du VIH) |
| FACS | Fluorescence-Activated Cell Sorter |
| -FITC | Fluorescéine Isothiocyanate |
| FSC | forward scatter |
| gag | group <u>s</u> pecific <u>a</u> ntigen |
| HAART | Highly Active Anti-Retroviral Therapy |
| HEPS | Highly Exposed Persistently Seronegative |
| HLA | Human Leucocyte Antigen |
| HTLV | Human T lymphotropic virus |
| IAVI | <i>International AIDS Vaccine Initiative</i> |
| ICAM | molécule d'adhésion intercellulaire |

| | |
|------------------|---|
| ICS | Intracellular Staining |
| IFN | <u>I</u> nter <u>f</u> éron |
| IL-2 | <u>I</u> nter <u>l</u> eukine 2 |
| LAV | virus associé à une lymphoadénopathie |
| LFA | antigènes associés à la fonction des leucocytes |
| LTNP | Long Term Non-Progressor |
| MIP-1 | Macrophage Inflammatory Protein 1 |
| MVA | modified virus Ankara |
| nef | <u>n</u> egative regulation <u>f</u> actor |
| NK | natural killer cell |
| NIH | National Institutes of Health |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PCR | Réaction d'amplification en Chaîne par la polymérase |
| -PE | Phycoérythrine |
| - PerCP | Péridinine Chlorophylle Protéine |
| pol | gène codant pour la <u>p</u> olymérase |
| rev | <u>r</u> égulateur de l' <u>e</u> xpression des protéines <u>v</u> irales |
| SSC | side scatter |
| SDF-1 | chemokine <u>s</u> tromal cell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor |
| SHIV | Simian hybride Immunodeficiency Virus (virus chimérique SIV/HIV) |
| SIDA | Syndrome de l'Immunodéficience Acquise |
| tat | <u>t</u> rans- <u>a</u> ctivateur de <u>t</u> ranscription |
| TCR | T Cell Receptor |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| Vbx | gène codant pour une famille ou sous famille de la chaîne variable β du TCR |
| vif | <u>v</u> iral <u>i</u> nfectivity <u>f</u> actor |
| VIH / HIV | Virus responsable du syndrome d'immunodéficience acquise humaine |
| VIS / SIV | Virus responsable du syndrome d'immunodéficience acquise simienne |
| VRC | Vaccine Research Center |

SOMMAIRE

| | |
|------------------------|--|
| Remerciements | |
| Résumé / Abstract | |
| Liste des abréviations | |

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE 1 : Le SIDA, Syndrome d'Immunodéficience Acquise | 2 |
| I. Découverte de la maladie et de son agent étiologique | 2 |
| II. Le virus de l'immunodéficience humaine 1 ou VIH-1 | 3 |
| II.1. Structure du VIH-1 | 3 |
| II.2. Organisation génomique du VIH-1 | 5 |
| II.3. Les cellules cibles du VIH-1 : Tropisme cellulaire | 6 |
| II.4. Le cycle de réplication du VIH-1 | 9 |
| II.5. Variabilité génétique du VIH-1 | 12 |
| II.6. Diversité du VIH-1 | 13 |
| II.7. La distribution géographique des différentes formes du VIH-1 | 15 |
| III. Epidémiologie | 16 |
| CHAPITRE 2 : Pathogenèse du SIDA | 18 |
| I. Evolution immunobiologique de l'infection par le VIH-1 | 18 |
| II. Evolution clinique de l'infection par le VIH-1 | 19 |
| III. Profils d'évolution particulière et de résistance naturelle au VIH | 22 |
| III.1 Patients non progressseurs à long terme (LTNP) | 22 |
| III.2. Personnes hautement exposées au virus et séronégatives (HEPS) | 23 |
| IV. La réponse immunitaire | 24 |
| IV.1. Généralités | 24 |
| IV.2. La réponse immunitaire contre le VIH-1 | 27 |
| IV.2.1. La réponse innée à l'infection par le VIH-1 | 27 |

| | |
|--|----|
| IV.2.2. La réponse adaptative à l'infection par le VIH-1 | 28 |
| IV.2.2.1. La réponse humorale | 30 |
| IV.2.2.2. La réponse cellulaire | 30 |
| V. Les traitements actuels | 35 |
| V.1. Thérapies antirétrovirales | 35 |
| V.2. Diverses stratégies vaccinales contre le VIH-1 | 39 |

CHAPITRE 3 : Diversité clonale des lymphocytes T CD8+ générés après immunisations ou infection par le VIH-1

| | |
|--|----|
| I. Modèle animal et SIDA | 50 |
| II. Réponse immunitaire des lymphocytes T CD8+ | 53 |
| II.1. Identification de lymphocytes T CD8+ par leur TCR | 55 |
| II.1.1. V β répertoire d'une population de lymphocytes T CD8+ | 56 |
| II.1.2. Séquençage des CDR3 du TCR β de lymphocytes T CD8+ | 58 |
| II.1.3. Capacité des lymphocytes T CD8+ à reconnaître différents variants d'un même épitope: Plasticité du TCR | 61 |
| II.2. Fonctions des lymphocytes T CD8+ | 63 |

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

MATERIEL ET METHODES

| | |
|---|----|
| I. Immunisations et infections des singes rhésus | 69 |
| I.1. Phénotype des singes | 69 |
| I.2. Immunisations | 69 |
| I.3. Infections des singes | 70 |
| II. Evaluation de la capacité de liaison de variants peptidiques de p41A au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, Mamu-A*01 | 72 |
| III. Evaluation de la capacité de différents types d'immunisations à générer des lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître différents isolats de VIH-1 | 75 |
| III.1. Fabrication des tétramères | 76 |

| | |
|--|----|
| III.2. Culture cellulaire et stimulation peptidique de PBMC | 78 |
| III.3. Identification de CTL capables d'interagir avec des tétramères spécifiques d'un variant de p41A : Immunophénotypage (1) | 78 |
| III.4. Mesure du potentiel cross-réactif de CTL capables de reconnaître des variants de p41A: double marquage - Immunophénotypage (2) | 80 |
| IV. Etude de la diversité clonale de CTL générés après vaccinations utilisant l'enveloppe du VIH-1 comme immunogène ou après infection par SHIV de singes rhésus Mamu-A*01+..... | 83 |
| IV.1. Réalisation d'une banque d'ADNc relatifs à chaque population de lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un variant de p41A | 84 |
| IV.2. V β répertoire de chaque population de lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un variant de p41A | 85 |
| IV.3. Clonotypage des CTL par le séquençage des CDR3 du TCR β impliqué dans la reconnaissance de l'épitope | 86 |
| V. Etude fonctionnelle des lymphocytes T spécifiques de différents variants de p41A générés après immunisations et infections de singes rhésus Mamu-A*01+ | 88 |
| V.1. IFN- γ ELISpot | 88 |
| V.2. Marquage Intracellulaire des cytokines (ICS) | 89 |
| V.2.1. Culture cellulaire et stimulation des PBMC | 90 |
| V.2.2. Marquage des PBMC stimulées | 92 |

RESULTATS 94

ARTICLE 1 : “Diverse cross-reactive potential and V β gene usage of an epitope specific CTL population in monkeys immunized with diverse HIV-1 Env immunogens” 97

ARTICLE 2 : “Vaccine-induced CD8+ T lymphocytes of rhesus monkeys recognize variant forms of a viral epitope but do not mediate optimal functional activity after binding to the variant epitope peptides”109

DISCUSSION 150

| | |
|--|-----|
| I. Cross-réactivité et protection contre le VIH-1..... | 152 |
| II. L'analyse du V β répertoire | 155 |
| III. Rôle des clonotypes publics | 156 |
| IV. Plasticité du TCR | 158 |

| | |
|---|-----|
| V. Avidité du TCR | 160 |
| VI. Autres acteurs du système immunitaire | 161 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 162 |
|-----------------------------------|-----|

| | |
|------------------------------------|-----|
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 165 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|----------------|-----|
| ANNEXES | 181 |
|----------------|-----|

| | |
|---|-----|
| ARTICLE 3 : “Dominant CD8+ T-lymphocyte responses suppress expansion of vaccine-elicited subdominant T lymphocytes in rhesus monkeys challenged with pathogenic simian-human immunodeficiency virus” | 182 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Liste des Communications scientifiques | 190 |
|---|-----|

LISTE DES FIGURES

Figures de la section “Introduction” :

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Structure schématique d'une particule virale du VIH-1 | 4 |
| Figure 2 : Génome du VIH-1 | 5 |
| Figure 3 : Représentation schématique des étapes de l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte. | 7 |
| Figure 4 : Co-récepteur du VIH-1 et tropisme viral | 8 |
| Figure 6 : Cycle de réplication du VIH-1 | 11 |
| Figure 7 : Mécanismes moléculaires associés aux variations génétiques du VIH-1 | 13 |
| Figure 8 : Arbres phylogénétiques des sous-types majeurs identifiés dans le groupe M du VIH-1 | 14 |
| Figure 9 : Distribution globale des diverses souches du VIH-1 et leurs prévalences dans le monde | 15 |
| Figure 10 : Estimation sur l'épidémie mondiale du SIDA | 16 |
| Figure 11 : Profil d'évolution de l'infection par le VIH-1 | 20 |
| Figure 12 : Exemples d'association entre HLA et progression de la maladie liée au VIH-1. | 23 |
| Figure 13 : Observations sur des individus séronégatifs à expositions répétées au VIH-1 | 23 |
| Figure 14 : Acteurs de la réponse immunitaire innée et acquise | 24 |
| Figure 15 : Réponse immunitaire adaptative contre l'infection par le VIH-1 | 26 |
| Figure 16 : Réponse immunitaire suivant l'infection par le VIH-1 | 29 |
| Figure 17 : Relation entre la réponse des CTL et la charge virale | 32 |
| Figure 18 : Alignement composé des réponses immunitaires innée et adaptative les plus précoces détectées après infection par le VIH-1 | 34 |
| Figure 19 : Mécanismes potentiels de l'échec de la réponse immunitaire dans l'infection par le VIH-1 | 34 |
| Figure 20 : Différentes classes d'antirétroviraux utilisés comme traitement dans l'infection du VIH-1 | 35 |
| Figure 21 : Immunogénicité/sécurité des différentes stratégies vaccinales contre le VIH-1.. | 40 |

| | |
|---|-------|
| Figure 22 : Relations phylogénétiques des lentivirus | 51 |
| Figure 23 : Processing de l'antigène à la suite d'une infection par le VIH-1 ou après immunisation | 54 |
| Figure 24 : Reconnaissance d'un peptide présenté par le CMH-I de la cellule présentatrice de l'antigène, par le TCR du lymphocyte T CD8+ : implication des chaînes variables α et β | 55 |
| Figure 25 : Expression et réarrangement des gènes codant pour les chaînes α et β du récepteur du lymphocyte T | 59 |
| Figure 26 : Placement des régions complémentaires déterminantes autour du peptide (épitope) présenté par CMH-I | 61 |
| <u>Figures de la section “Matériel et Méthodes” :</u> | |
| Figure 27 : Diversité clonale des lymphocytes T CD8+ élicités après vaccinations de singes rhésus Mamu-A*01+ | 66-67 |
| Figure 28 : Mesure de l'affinité de variants peptidiques de p41A pour Mamu-A*01 | 74 |
| Figure 29 : Usage de tétramères pour marquer des lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un épitope | 77 |
| Figure 30 : Marquage intracellulaire de l'IFN- γ et IL-2 | 89 |
| Figure 31: Procédure du marquage intracellulaire utilisé pour identifier les lymphocytes capables de reconnaître des variants de p41A et de produire des cytokines | 93 |
| <u>Figures de l'Article 1 :</u> | |
| Figure 1 : Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8+ T-lymphocyte populations in 89.6P Env-immunized Mamu-A*01+ rhesus monkeys | 100 |
| Figure 2 : Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8+ T-lymphocyte populations in 89.6P Env-immunized Mamu-A*01+ rhesus monkeys following SHIV-89.6P challenge .. | 101 |
| Figure 3 : V β repertoire analysis of p41A epitope-specific CD8+ T-lymphocyte populations in 89.6P Env-immunized Mamu-A*01+ rhesus monkeys following vaccination and challenge | 102 |
| Figure 4 : Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8+ T-lymphocyte populations in HxB2 Env-immunized Mamu-A*01+ rhesus monkeys following vaccination and challenge | 103 |
| Figure 5 : p41A-specific IFN- γ ELISPOT responses of PBMC from Env-immunized Mamu-A*01+ rhesus monkeys | 103 |

| | |
|---|-----|
| Figure 6 : V β repertoire analysis of p41A epitope-specific CD8 T-lymphocyte populations in HxB2 Env-immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys following vaccination and challenge | 104 |
| Figure 7 : Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8 T-lymphocyte populations in clade C Env-immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys following vaccination and challenge ... | 105 |
| Figure 8 : V β repertoire analysis of p41A epitope-specific CD8 T-lymphocyte populations in clade C Env-immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys following vaccination and challenge | 106 |

Figures de l'Article 2 :

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Relative binding inhibition of ¹²⁵ I-p41A to the rhesus monkey MHC class I molecule <i>Mamu-A*01</i> by HxB2-p41A and variant p41A peptides | 122 |
| Figure 2 : Recognition and cross-recognition of HxB2-p41A and variants of p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in <i>Mamu-A*01</i> ⁺ rhesus monkeys infected with SHIV-KB9 | 125 |
| Figure 3 : TCR β CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys infected with SHIV-KB9 | 127 |
| Figure 4 : Recognition of 89.6P-p41A, HxB2-p41A and 7 other variant p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys that were later infected with SHIV-KB9 | 129 |
| Figure 5 : V β repertoire analysis of variant p41A epitope-specific CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys | 132 |
| Figure 6 : V β repertoire analysis of variant p41A epitope-specific CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys infected with SHIV-KB9.. | 133 |
| Figure 7 : TCR β CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkey infected with SHIV-KB9 | 135 |
| Figure 8 : Cytokine production of variant-p41A-specific CD8+T lymphocytes elicited in <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys immunized with 89.6P Env and infected with SHIV-KB9. | 137 |
| Suppl. Figure 1 : Cross-recognition of 89.6P-p41A, HxB2-p41A and 7 other variant p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys | 142 |
| Suppl. Figure 2 : Recognition of diverse variants of p41A by a subset of PBMC elicited in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys following stimulation by p41A epitope peptides from selected clade B HIV-1 isolats | 143 |
| Suppl. Figure 3 : Cross-recognition of 89.6P-p41A, HxB2-p41A and 7 other variant p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized <i>Mamu-A*01</i> + rhesus monkeys infected with SHIV-KB9 | 144 |

Suppl. Figure 4 : Recognition of diverse variant p41A epitope peptides by a subset of PBMC elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01*+ rhesus monkeys infected with SHIV-KB9, following stimulation by p41A epitope peptides from selected clade B HIV-1 isolates ... 145

Suppl. Figure 5 : TCR β CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01*+ rhesus monkey infected with SHIV-KB9 146

Suppl. Figure 6 : TCR β CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01*+ rhesus monkey infected with SHIV-KB9 147

Suppl. Figure 7 : TCR β CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01*+ rhesus monkey infected with SHIV-KB9 148

Suppl. Figure 8 : Gating strategy used to identify cytokine producing T cells interacting with tetramers constructed with variants of the p41A epitope peptide 149

Figures des sections “Discussion” et “Conclusion / Perspectives”:

Figure 32 : Comparaison des clonotypes publics observés dans les différents groupes de singes 157

Figure 33 : Clonotypes publics capables de reconnaître p41A (Env), p11C (Gag), p199RY (Nef) 159

Figure 34 : Réseau complexe de la pathogenèse des VIH et VIS 163

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux de la section "Introduction" :

| | |
|--|----|
| Tableau I : Stratégies vaccinales contre le VIH-1 | 40 |
| Tableau II : Vaccins prophylactiques contre le VIH-1 en cours d'essais cliniques | 45 |
| Tableau III : Caractéristiques des infections du HIV-1, du SIV et du virus chimérique SHIV-89.6P | 52 |

Tableaux de la section "Matériel et Méthodes" :

| | |
|--|----|
| Tableau IV: Immunisations et infections des singes rhésus Mamu-A*01+ | 70 |
|--|----|

Tableaux de l'Article 1 :

| | |
|--|-----|
| Table I : Sequences of nonamer peptides used to stimulate and stain p41A epitope-specific CD8+ T lymphocytes | 100 |
| Table II : Analysis of CDR3 sequences in clade C-p41A and 89.6P-p41A epitope-specific CD8+ T-lymphocyte populations in <i>Mamu-A*01+</i> rhesus monkeys vaccinated with clade C Env and challenged with SHIV-89.6P | 107 |

Tableaux de l'Article 2 :

| | |
|---|-----|
| Table I: Naturally occurring variants of the HIV-1 Env p41A epitope peptides tested for their affinity for the rhesus monkey MHC class I molecule Mamu-A*01 | 121 |
|---|-----|

LISTE DES ANNEXES

| | |
|---|-----|
| Article 3 : “Dominant CD8+ T-lymphocyte responses suppress expansion of vaccine-elicited subdominant T lymphocytes in rhesus monkeys challenged with pathogenic simian-human immunodeficiency virus” | 181 |
| Liste des communications scientifiques | 190 |

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

Le SIDA, Syndrome d'Immunodéficience Acquise

I. Découverte de la maladie et de son agent étiologique

En Juin 1981, des cliniciens américains ont rapporté un nombre de cas de pneumocystose due au parasite chez cinq hommes homosexuels¹. Or aux Etats-Unis, ce type de pathologie rare était presque exclusivement limitée à des patients sévèrement immunodéprimés. L'apparition de pneumocystose associée à des candidoses buccales, de multiples infections virales, et au sarcome de Kaposi chez de jeunes individus préalablement sains était l'évidence d'un nouveau type d'immunodéficience acquise². En effet, tous les patients présentaient une anergie et une lymphopénie caractérisée notamment par une baisse significative du nombre de lymphocytes T CD4+.

Par la suite, les premiers cas de ce qui sera reconnu plus tard comme le syndrome d'immunodéficience acquise apparaissent en France. En Décembre 1982, l'équipe du Pr. Luc Montagnier à l'Institut Pasteur fut contactée par des cliniciens français dans le but d'isoler un nouveau virus humain associé à une lymphoadénopathie (LAV), à partir de biopsie de ganglion lymphatique d'un patient français homosexuel. A cette époque, le seul rétrovirus connu était le HTLV, Human T lymphotropic virus, capable de causer la transformation de cellules T chez l'Homme. Or, en Mai 1983, Françoise Barré-Sinoussi démontrait qu'il n'y avait pas ou peu de cross-réactivité entre les

protéines du nouveau virus et celles du HTLV-1, et décrivait une de ses protéines, la p25, indiquant ainsi qu'il s'agissait bien d'un nouveau virus^{3,4}. Afin de déterminer si ce virus nouvellement isolé était vraiment responsable de la maladie affectant les patients atteints de syndrome d'immunodéficience acquise, un test sérologique a été mis au point et utilisé dans des études séro-épidémiologiques impliquant un réseau de collaborations entre cliniciens, immunologistes et biologistes moléculaires⁵. De manière cruciale, ce même test a été utilisé comme outil de diagnostic pour des tests sanguins.

En 1984, Gallo et al. et Levy et al. confirmaient que l'agent étiologique responsable du SIDA était un nouveau rétrovirus, le virus de l'immunodéficience acquise humaine ou VIH^{6,7}.

Bien que quelques cas de SIDA associés au VIH-2 aient été observés⁸, nous nous limiterons ici au VIH-1 responsable de la pandémie du SIDA.

II. Le virus de l'immunodéficience humaine 1 ou VIH-1

Le VIH-1 est un rétrovirus (virus à ARN), membre de la famille des lentivirus (du latin *lenti* qui signifie lent) qui ont pour caractéristiques essentielles d'avoir une longue période d'incubation et d'être cytopathogènes.

II.1. Structure du VIH-1 (Figure 1) :

Un virion du VIH-1 infectieux contient deux copies simple brin d'ARN viral génomique de 9.2kb associées à des enzymes virales, l'intégrase (p32) et la

transcriptase inverse (p66/p51) et étroitement liées à une nucléocapside (p7). L'ARN est protégé des nucléases par une capsid virale protéique (p24) de forme conique entourée d'une matrice qui résulte de l'association de protéines, dont la p17, qui assure aussi l'intégrité du virion. Autour de la matrice deux couches de phospholipides forment l'enveloppe virale, Env ; elle est de même nature que la membrane de la cellule infectée et contient deux glycoprotéines virales, gp120 et gp41. Le complexe trimérique gp120/gp41 permet au virus de s'attacher et de fusionner avec la membrane de la cellule cible, et d'initier le cycle infectieux. Dès l'entrée du virus dans la cellule, l'ARN est soumis à l'action de la transcriptase inverse qui produit l'ADN double brin correspondant. Celui-ci entre alors dans le noyau et intègre le génome de la cellule hôte pour générer un provirus grâce à une autre enzyme virale, l'intégrase. Le provirus intégré devient une matrice pour la transcription des gènes de structure, de régulation et des gènes accessoires du virus.

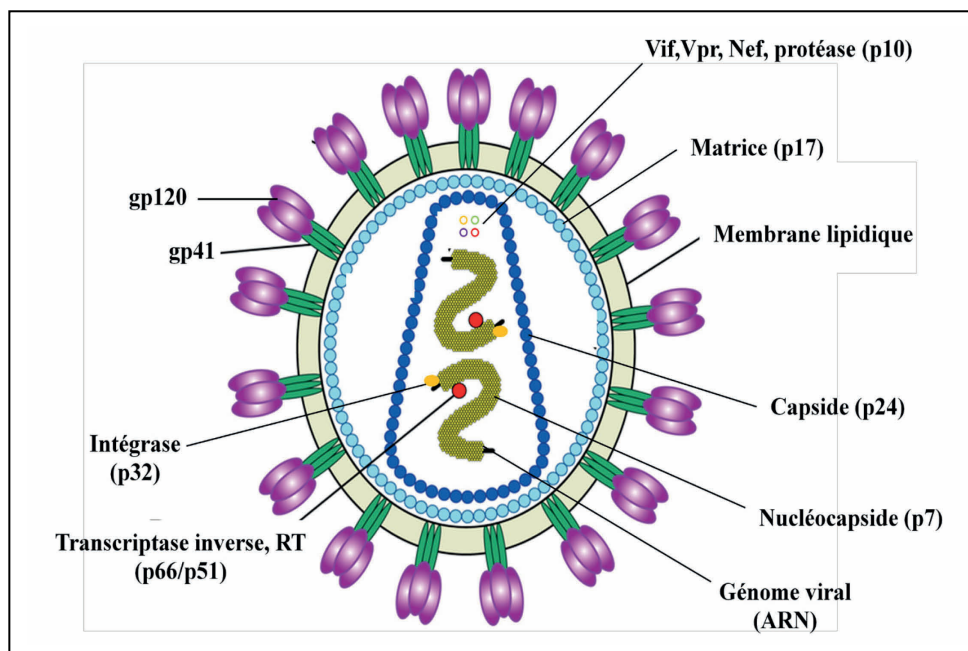


Figure 1: Structure schématique d'une particule virale du VIH-1

II.2.Organisation génomique du VIH-1 (Figure 2) :

L'intégration du génome du VIH-1 au génome de la cellule hôte conduit à l'expression de neuf gènes (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) qui codent pour seize protéines^{9,10}, (*HIV sequence compendium 2008*, NIH).

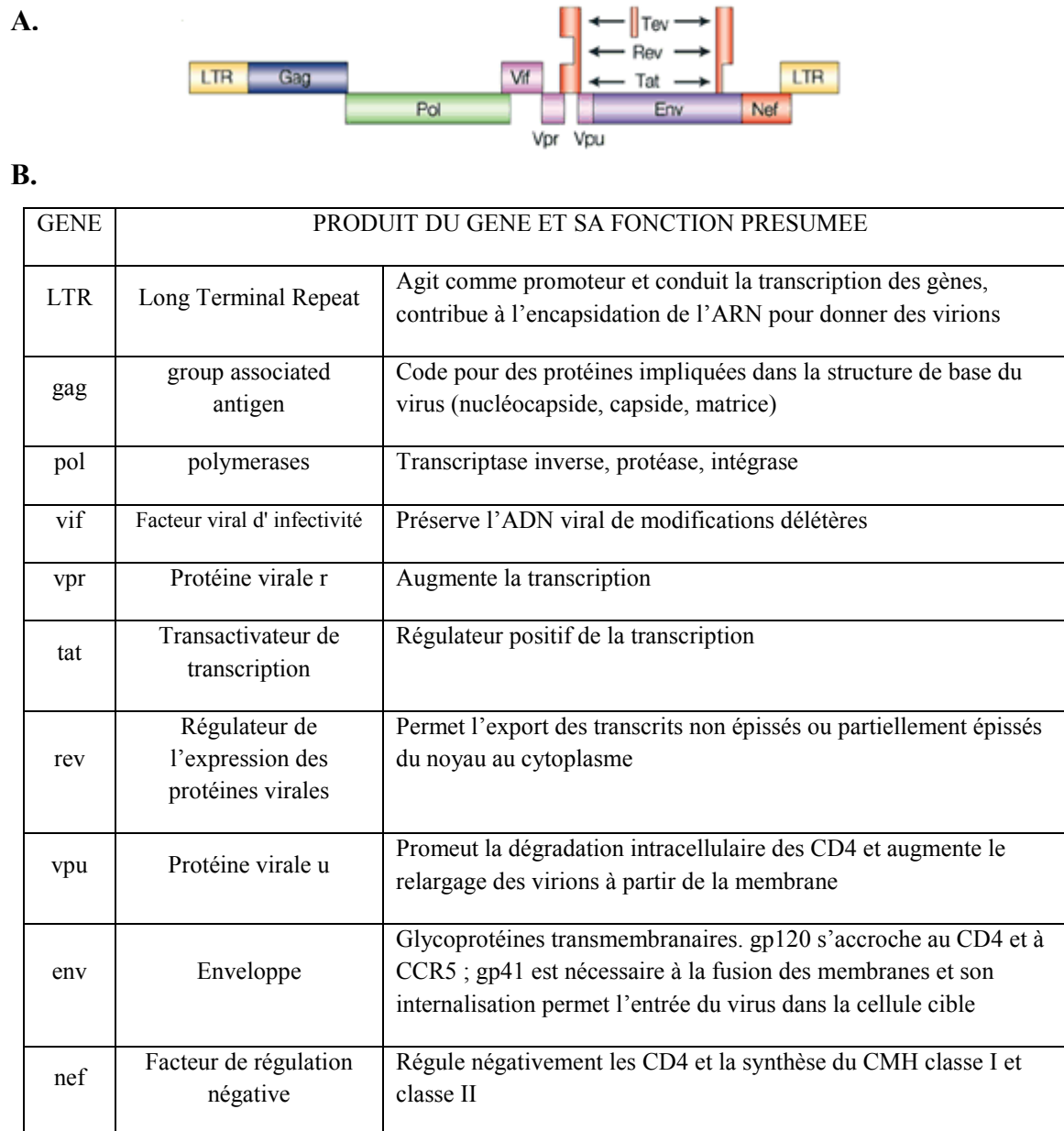


Figure 2 : Génome du VIH-1. A. Carte génétique. B. Protéines

Gag, pol et env sont des gènes communs à tous les rétrovirus¹⁰, (*HIV sequence compendium 2008*, NIH). Ces trois gènes contiennent l'information nécessaire à la

synthèse de protéines de structure et enzymatiques. Le gène gag code notamment pour des protéines constitutives des nucléocapside (p7), capsid (p24) et matrice (p17) du virion. Le gène pol (polymérase) code pour plusieurs enzymes du virion impliquées dans la réplication du virus comme la transcriptase inverse¹¹, la RNase et l'intégrase (p32). Le gène env code pour les précurseurs des glycoprotéines de l'enveloppe gp41 et gp120. La gp41 sert de souche ancrée dans la membrane ; elle est liée à la gp120 qui forme un chapeau au dessus de cette protéine d'ancrage. Ce complexe glycoprotéique a la capacité de s'accrocher aux lymphocytes T CD4+ par l'intermédiaire de récepteurs aux chimiokines comme CCR5 et CXCR4 qui facilitent l'entrée et l'infection des cellules T CD4+, des macrophages et des cellules dendritiques (Cf Introduction, II.3. Les cellules cibles du VIH-1).

Les gènes tat, rev codent pour des protéines régulatrices qui contrôlent la capacité du VIH-1 à infecter les cellules et à produire de nouvelles copies du génome viral (réplication). La synthèse des protéines Tat, Rev et Nef est précoce. Ensuite, la présence de Rev favorise l'expression plus tardive des gènes codant pour les protéines structurales.

Les gènes nef, vif, vpr et vpu codent pour des protéines accessoires dans la mesure où elles ne sont pas indispensables à la réplication virale. Elles jouent cependant des rôles essentiels au cours du cycle viral (notamment dans le relargage des particules virales infectieuses) et contribuent à la progression de la maladie¹².

II.3. Les cellules cibles du VIH-1 : Tropisme cellulaire

La capacité du VIH à pénétrer dans des types précis de cellules, appelée tropisme cellulaire, est déterminée par l'expression de récepteurs spécifiques à la surface des cellules hôtes, qui sont utilisés par le virus pour initier son cycle

infectieux. Les cellules qui expriment à leur surface une glycoprotéine appelée CD4 ("cluster" de différenciation 4) sont susceptibles d'être infectées par le VIH-1:

- les lymphocytes T CD4+ auxiliaires,
- les lymphocytes T régulateurs,
- les monocytes et les macrophages,
- et une sous population des cellules dendritiques^{13,14}.

Cependant, l'interaction entre le complexe gp120/gp41 et CD4 n'est pas suffisante et l'intervention de co-récepteurs est nécessaire pour induire un changement conformationnel de la gp41 qui conduit à la fusion des bicouches lipidiques de l'enveloppe virale et de la cellule hôte (Figure 3). Parmi ces corécepteurs figurent les récepteurs aux chimiokines: CCR5, récepteur des chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β , et CXCR4, récepteur de l' α -chimiokine SDF-1 ont été les premiers décrits et restent les plus importants^{15,16}.

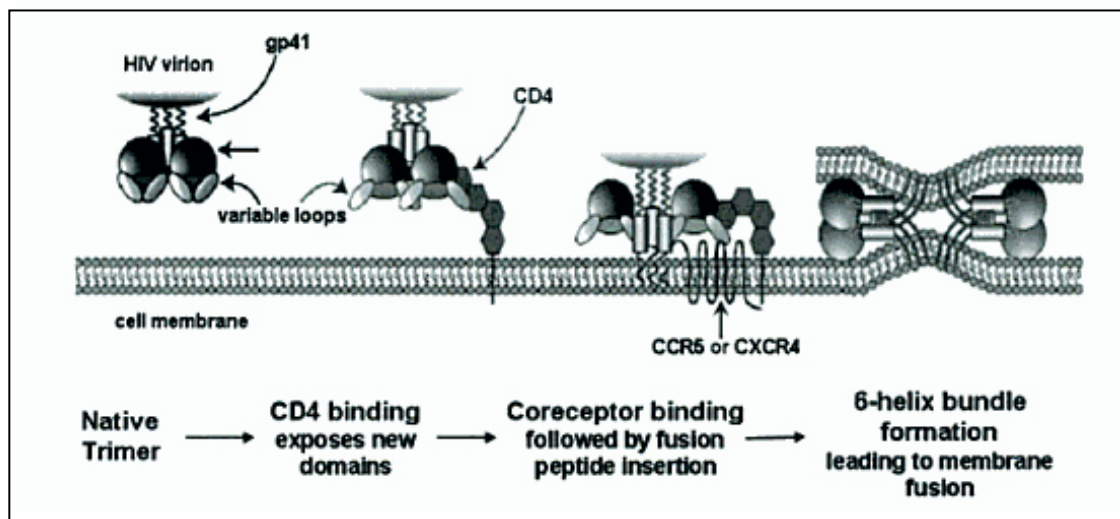


Figure 3 : Représentation schématique des étapes de l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte (Figure de Moore et al. 2003 adaptée par N.Letvin dans *Fundamental Immunology, William Paul, sixth edition.*)¹⁷

L'utilisation sélective de ces deux corécepteurs définit les différents tropismes des isolats du VIH-1. CCR5 sert de corécepteur aux souches R5 monocytotropiques du VIH-1 alors que CXCR4 est utilisé par les souches X4 lymphotropiques¹⁸⁻²⁰ (Figure 4).

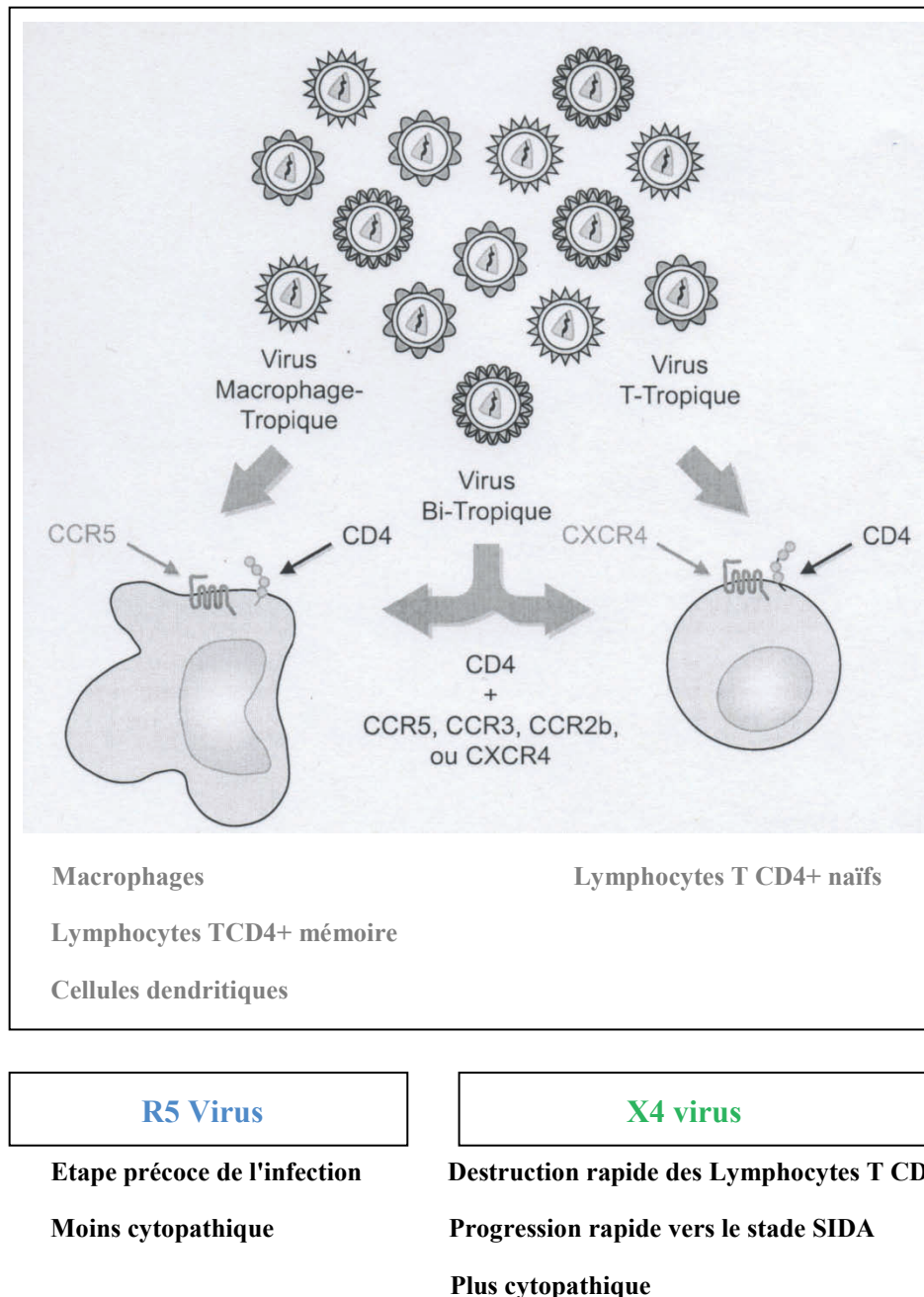


Figure 4 : Co-récepteur du VIH-1 et tropisme viral
 (adapté de Champagne et al.,1998)²¹

Aussi, certaines souches sont capables d'utiliser les deux corécepteurs pour entrer dans la cellule hôte ; elles sont dites à double tropisme R5/X4.

L'utilisation sélective des corécepteurs du VIH est déterminée par les séquences de la région V3 de la gp120²².

Lors des stades précoces de l'infection les virus R5 prédominent, alors que dans les stades plus tardifs de la maladie, les souches X4 plus cytopathiques émergent^{23,24}.

Finalement, un large nombre d'autres corecepteurs aux chimiokines peuvent aussi agir comme site d'attachement primaire ou secondaire du VIH, comme CCR2b et CCR3 mais ne sont pas communément impliqués dans l'infection¹⁸.

Par ailleurs, durant ces dix dernières années, une variété de protéines d'adhésion cellulaire ont été associées à l'infection par le VIH. Parmi celles-ci figurent les lectines de type C, comme le DC-SIGN (lectine de surface des cellules dendritiques) mais aussi les LFAs (antigènes associés à la fonction des leucocytes) et les ICAM (molécules d'adhésion intercellulaire)²⁵.

Plus récemment, l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ a été identifiée comme un site d'accrochage du VIH particulièrement sur les lymphocytes T CD4+ mémoires, ce qui pourrait expliquer la perte de ces cellules dans le tractus gastrointestinal durant la phase précoce de l'infection^{24,26}.

II.4. Le cycle de réplication du VIH-1 (Figure 6)

La première étape du cycle viral est le résultat de l'interaction du complexe gp120/gp41 de l'enveloppe du virus avec CD4 et un corécepteur (CCR5 ou CXCR4) qui conduit à la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte, comme il a été précédemment décrit (Cf. Introduction II.3. Les cellules cibles du VIH-1 et la Figure

3). La capside du virus pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule hôte, se désagrège et libère le complexe de pré-intégration qui comprend le génome viral (les deux brins d'ARN), l'intégrase, la nucléocapside, la transcriptase inverse, et la protéine virale r (Vpr)²⁷. Ce complexe possède la capacité d'interagir avec des éléments de la membrane nucléaire, pour traverser cette membrane et accéder à la chromatine cellulaire. En effet, il est reconnu par la machinerie cellulaire de transport et est dirigé vers les pores du noyau de la cellule hôte, en suivant apparemment un réseau de microtubules.

La transcription inverse commence et conduit à la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire (ADNc) double brin qui est ensuite transportée à l'intérieur du noyau en dehors de toute phase de division cellulaire. Cet import nucléaire constitue une particularité propre aux lentivirus qui sont capables d'infecter des cellules en phase stationnaire, donc avec le noyau intact.

Une fois dans le noyau, l'ADNc double brin au contact de la chromatine va s'intégrer au hasard dans le génome de la cellule hôte. Il est alors sous sa forme provirus. A ce moment, la séquence terminale répétée 5' LTR se comporte comme un promoteur eucaryotique et l'autre séquence terminale répétée à l'opposé, la 3' LTR, agit comme un site de polyadénylation et de terminaison.

La transcription du provirus produit divers ARN messagers (ARNm) : des transcrits non épissés ou épissés. Ceux-ci sont rapidement transportés dans le cytoplasme et codent pour les protéines précoces Tat, Rev et Nef. Rev est une petite protéine capable de se lier aux ARN ; elle contient une séquence d'export nucléaire qui lui permet de réguler le transport des ARNm du noyau au cytoplasme et contient aussi une séquence signal de localisation nucléaire. Elle joue donc un rôle dans le transport

des transcrits notamment ceux qui codent pour les protéines accessoires et pour le génome viral (ARN)²⁸. Les protéines de structure et les enzymes virales sont synthétisées et transportées vers la membrane plasmique où tous les composants des virions sont assemblés quand le bourgeonnement se produit. Nef facilite l'assemblage du virion. Gag recrute les composants des corps multivésiculaires au niveau du site de bourgeonnement de manière à ce que les virions immatures soient libérés de la cellule infectée.

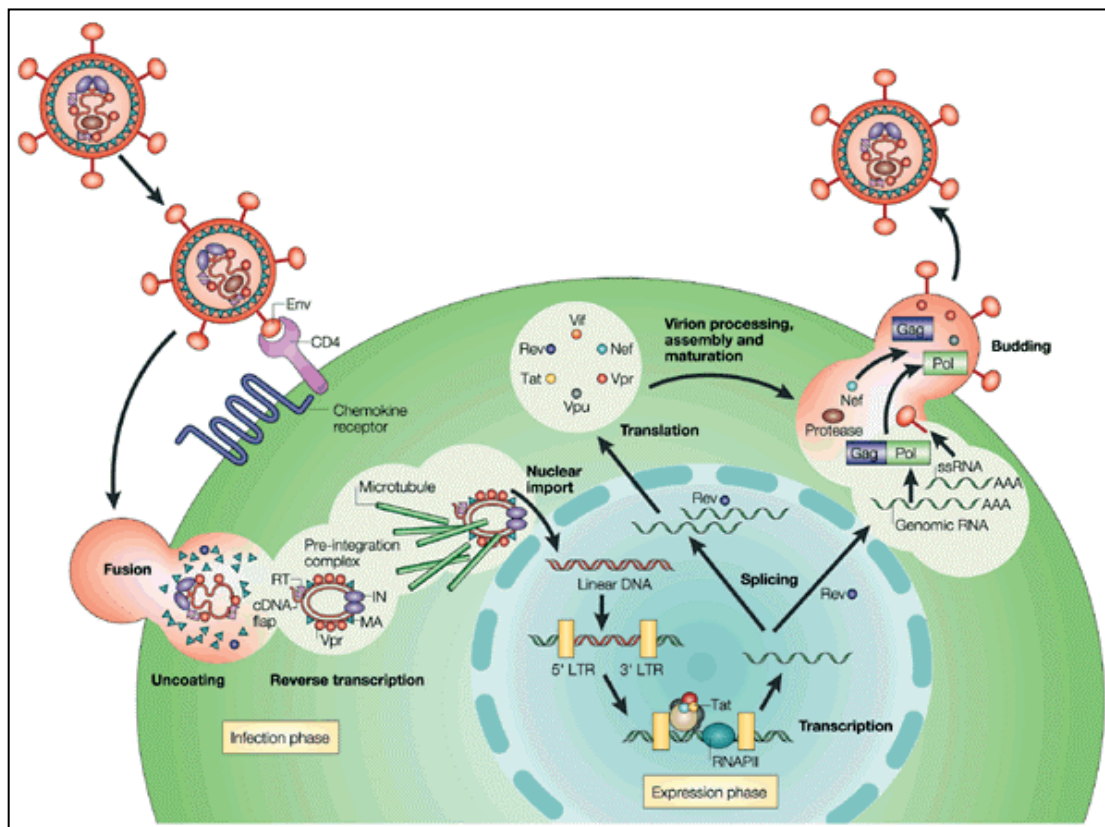


Figure 6: Cycle de réplication du VIH-1¹⁰ (Peterlin et Trono 2003)

(RT: transcriptase inverse; IN: intégrase; MA: Matrice; LTR: long terminal repeat; Tat : transactivateur de transcription; Rev : Régulateur de l'expression des protéines virales; Nef : Facteur de régulation négative; Gag : groupe spécifique de l'antigène; RNA PII : ARN polymérase II; Pol : polymérase; ss RNA : ARN à simple épissage)¹⁰

II.5. Variabilité génétique du VIH-1

La variabilité génétique du VIH-1 est due à son cycle de réplication rapide avec la génération de un à dix milliards de virions chaque jour, couplé à un fort taux de mutations qui apparaissent durant la réplication du virus ; une a dix mutations par génome et par cycle sont dues au manque d'activité 3' exonucléasique de relecture de la transcriptase inverse²⁹. Aussi, quand une cellule est infectée simultanément par plusieurs souches différentes du VIH, le nouveau virion contient les brins d'ARN des deux souches, et le génome du virion hybride sera un ADN recombinant issu de la recombinaison des deux génomes parentaux³⁰. Ces deux mécanismes participent à la variabilité du virus et donc à sa capacité d'échappement aux défenses immunitaires de la cellule hôte (Figure 7).

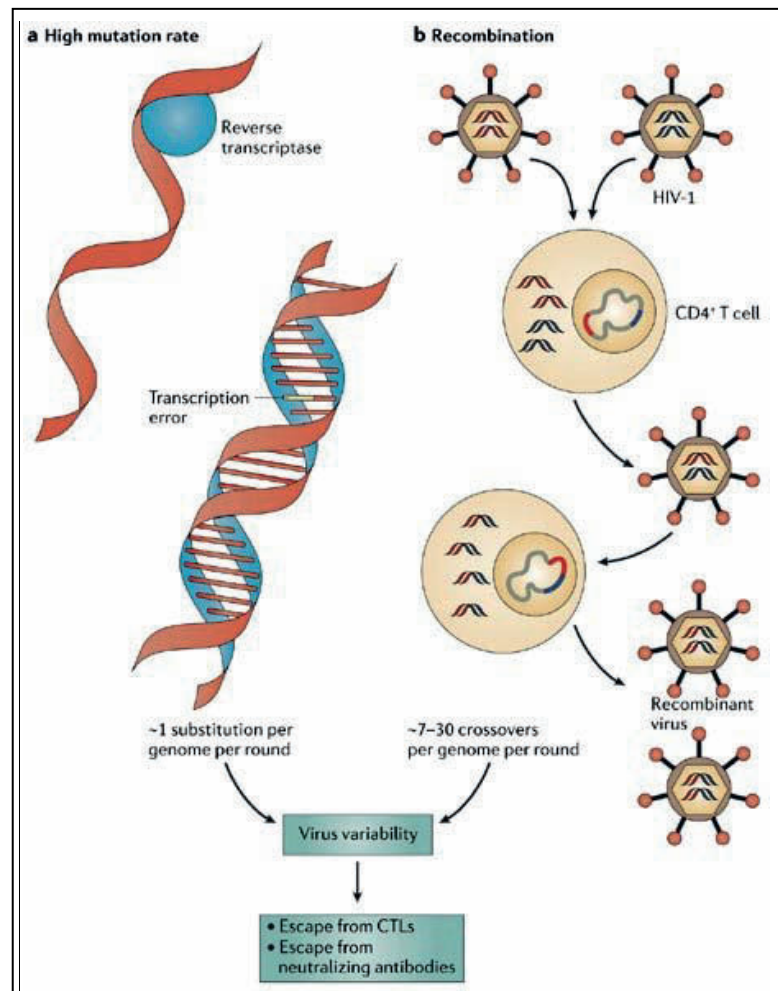


Figure 7 : Mécanismes moléculaires associés aux variations génétiques du VIH-1 (d'après Letvin, 2006). a. La transcriptase inverse commet de nombreuses erreurs qui conduisent approximativement à une nouvelle mutation pour chaque nouveau virion. b. Dans les lymphocytes T CD4+, la recombinaison virale peut aussi être à l'origine des variations génétiques du VIH-1: quand deux virions HIV-1 avec différentes séquences génétiques entrent dans une même cellule, chacun de leur génome peut intégrer le génome de la cellule hôte et produire un nouvel ARN viral. Une recombinaison homologue ou un assemblage d'ARN de différents virus parentaux conduit à la création de nouveaux génomes du VIH-1³¹.

II.6. Diversité du VIH-1

L'analyse de séquences nucléotidiques virales a permis de classer en groupes distincts, nommés sous-types ou clades, différents isolats du VIH-1 et de définir leurs

liens ou leurs divergences par des méthodes phylogénétiques³²⁻³⁴. En 1992, une première classification des VIH-1 a été établie par Meyers et al., regroupant cinq clades de A à E. Il est à noter que la variabilité n'est pas la même sur tout le génome viral. Parmi les gènes codant pour les protéines de structure, le gène env est le plus variable et le gène pol le plus conservé. C'est l'analyse des gènes env et gag qui est la plus utilisée pour étudier la diversité génétique du VIH-1³². Depuis 1998, les VIH-1 sont classés en trois groupes : M (majeur), O ("outlier") et N (non M/non O, nouveau)³⁵⁻³⁸. Basé notamment sur l'analyse de génomes entiers du VIH-1, la composition du groupe M, responsable de plus de 90 % des cas reportés de SIDA, a été établie à 9 clades (de A à D, de F à H, J et K), auxquels s'ajoutent les formes recombinantes (*circulating recombinant forms*, ou CRF), CRF01_AE et CRF02_AG^{37,39-41}. Un exemple d'arbres phylogénétiques illustrant les distances entre les sous-groupes du VIH-1 est présenté sur la Figure 8.

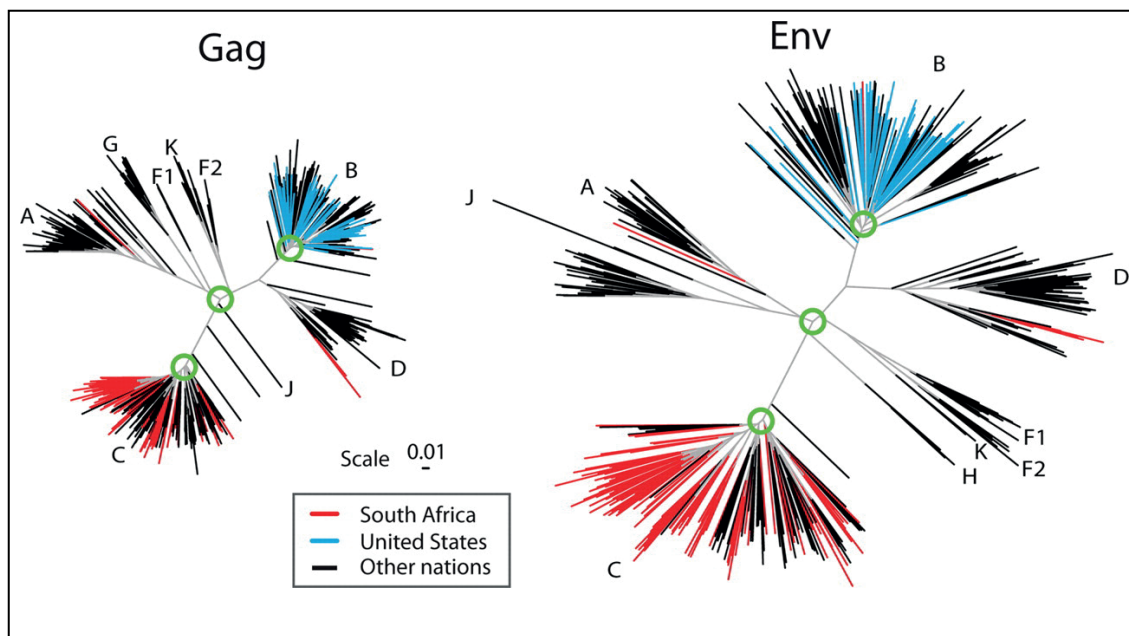


Figure 8 : Arbres phylogénétiques des sous-types majeurs identifiés dans le groupe M du VIH-1 (Korber et al., 2009)⁴¹. Ces arbres sont basés sur l'alignement de séquences de Gag et de l'enveloppe répertoriées dans les bases de données de Los Alamos.

II.7. La distribution géographique des différentes formes du

VIIH-1 (Figure 9)

Elle n'est pas homogène : Ainsi, en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis, le clade B est prédominant alors que les clades A et C sont présents en Afrique et les clades C et E en Asie⁴¹⁻⁴⁴.

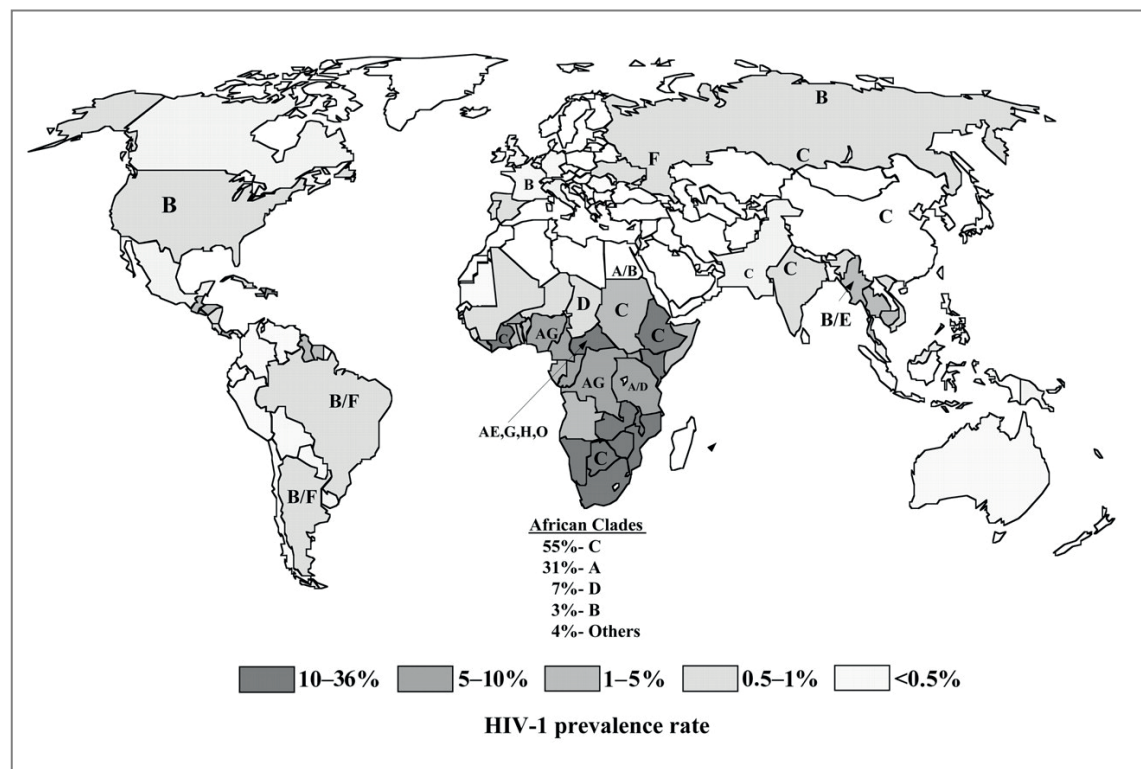


Figure 9 : Distribution globale des diverses souches du VIH-1 et leurs prévalences dans le monde (Spira et al., 2003)⁴³.

La diversité du VIH-1 a des implications dans la compréhension des modes de transmission et de la pathogénicité des diverses formes du virus et peut aussi influencer le diagnostic. Elle représente un obstacle majeur au développement d'un vaccin^{31,41,44}.

III. Epidémiologie

Les estimations sur l'épidémie mondiale de SIDA réalisées par l'ONUSIDA rapportent que 33,4 millions de personnes vivent avec le SIDA (rapport du 29 Juillet 2008, consultable à l'adresse suivante: www.unaids.org). En 2007, 2,7 millions de personnes ont été nouvellement infectées par le VIH et 2 millions de patients sont décédés du SIDA.

Plus de 25 millions de personnes sont mortes du SIDA depuis le début de l'épidémie. Les zones géographiques les plus touchées par la pandémie sont l'Afrique subsaharienne avec plus de 22 millions de personnes infectées, soit plus de 5 % des adultes, et l'Asie du Sud/Sud-Est avec 3,8 millions de personnes vivant avec le VIH (Figure 10). C'est aussi dans ces régions que le nombre de nouvelles infections par an est le plus élevé. Dans certains pays d'Afrique sub-saharienne, comme le Zimbabwe ou le Botswana, plus de 25% des adultes sont infectés par le VIH.

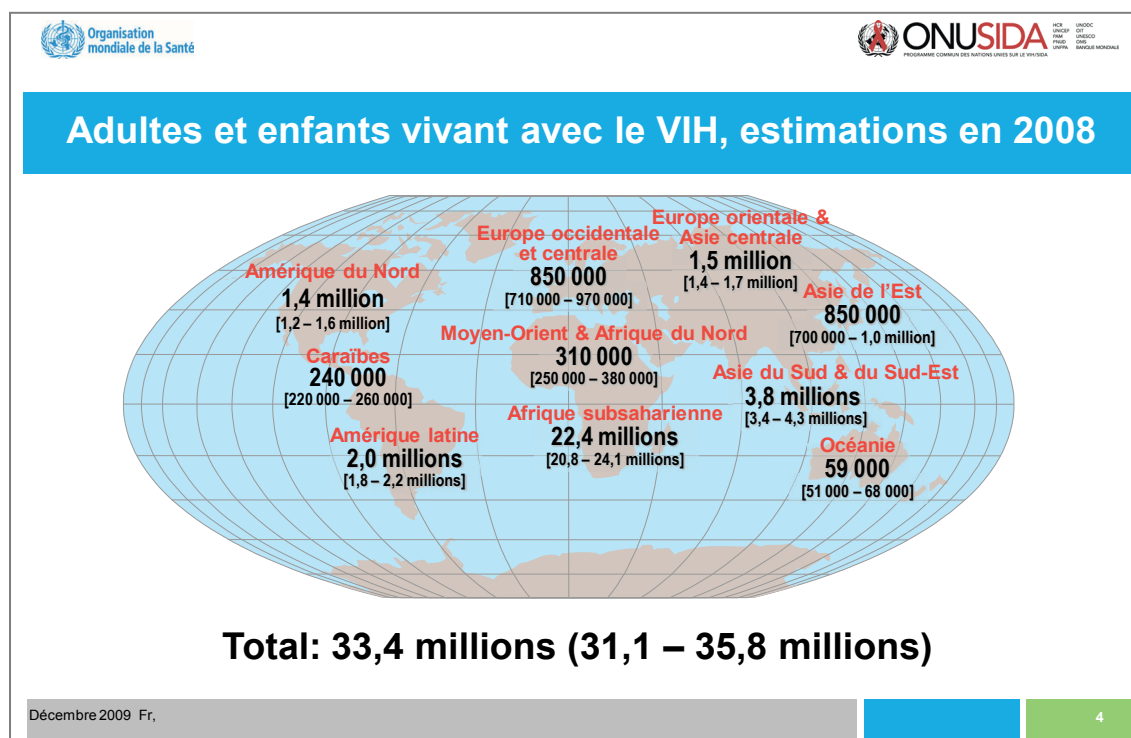


Figure 10 : Estimation sur l'épidémie mondiale du SIDA (UNAIDS, 2008)

Par ailleurs, les enfants ne sont pas épargnés par l'épidémie: en effet, la transmission mère-enfant constitue le 3ème mode de transmission du virus, après la transmission par contact sexuel et celle par voie sanguine⁴⁵⁻⁴⁷. En 2007, plus de 2 millions d'enfants de moins de 15 ans ont été recensés comme vivant avec le SIDA et 280 000 en sont décédés. Le SIDA constitue donc un problème majeur de santé publique.

CHAPITRE 2

Pathogenèse du SIDA

Un réseau complexe de mécanismes immunopathogéniques multifactoriels et multiphasiques sont impliqués dans l'établissement et la progression de la maladie associée au VIH^{48,49}.

I. Evolution immunobiologique de l'infection par le VIH-1

Dès que le VIH traverse la barrière muqueuse, il est capable d'infecter les cellules qui expriment CD4 et CCR5 (lymphocytes T CD4+, monocytes/macrophages, et cellules dendritiques) et peut commencer à se répliquer. Le virus est présumé capable de progresser des muqueuses aux ganglions lymphatiques les plus proches et donc de se propager rapidement par voie sanguine aux tissus lymphatiques et aux autres compartiments anatomiques du corps. Le pic de réplication virale apparaît 2 à 4 semaines après la transmission du virus (courbe rouge sur la figure 11). A ce moment, les réponses humorales et cellulaires spécifiques au virus sont totalement mobilisées; le taux de virus dans le sang peut excéder 10^7 copies d'ARN viral/ml de plasma. Puis, la réplication s'essouffle rapidement sous l'effet des réponses immunitaires spécifiques au virus. Neuf à douze semaines après l'infection initiale, un niveau faible de charge virale est communément atteint. Il est approximativement de 30 000 à 50 000 copies d'ARN viral/ml de plasma chez des individus non traités.

Parce que les lymphocytes T CD4⁺ mémoires expriment CCR5 et que les cellules activées sont particulièrement sujettes à la réplication du virus, il est constaté une perte rapide et dramatique de ce type de cellules, dès les premiers jours qui suivent l'infection par le VIH-1⁵⁰ (courbe bleue sur la figure 11). Un très large nombre de lymphocytes sont présents dans le tissu lymphatique associé aux intestins, qui inclut en majorité des lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant CCR5. L'appareil digestif est donc un site où la perte importante de ces cellules est observée très tôt après infection par le VIH-1. Cependant, la perte des lymphocytes T CD4⁺ mémoires, activés, concerne tous les compartiments anatomiques des individus infectés.

Inversement, si le virus infecte des cellules CD4⁺ non activées comme des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ou mémoires, des monocytes ou des macrophages, des cellules dendritiques, il peut persister à un stade latent pendant des années⁵¹. Ces cellules qui constituent des réservoirs latents de virus représentent un obstacle majeur dans l'éradication du VIH.

II. Evolution clinique de l'infection par le VIH-1 (Figure 11):

Lors de la progression de l'infection par le VIH-1, une étroite association entre le niveau de réplication du virus et la destruction des lymphocytes T CD4⁺ est notable. En effet, la baisse du nombre de lymphocytes CD4⁺ est directement corrélée à la charge virale.

La charge virale et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ sont donc deux indicateurs biologiques qui permettent de suivre l'évolution de la maladie à partir de l'infection par le virus.

Le nombre normal de lymphocytes T CD4⁺ est de 800 à 1050 cellules/mm³ de plasma mais peut varier de 500 à 1400 cellules /mm³ de plasma.

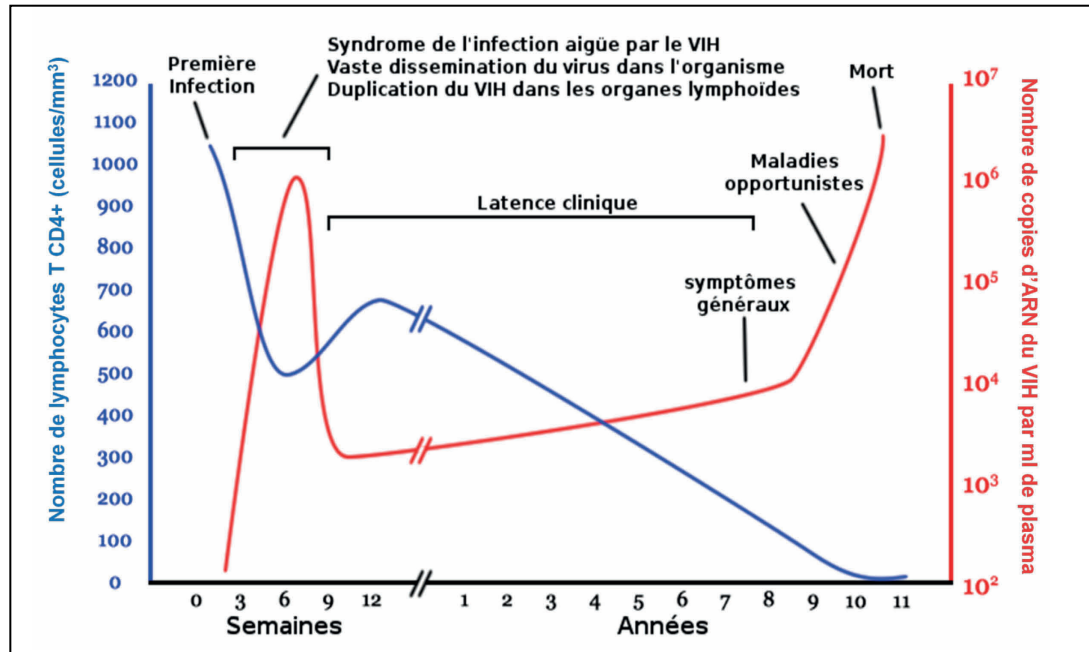


Figure 11: Profil d'évolution de l'infection par le VIH-1

La progression de l'infection se déroule en trois phases successives : la phase aiguë ou primo-infection, la phase de latence et la phase chronique symptomatique du SIDA.

La phase de primo-infection:

Les premiers jours après l'infection par le VIH, des symptômes rapportés comme un syndrome rétroviral aigu, apparaissent en association avec la réplication intense du virus. Ce syndrome est caractérisé par une poussée de fièvre soudaine associée à un gonflement des ganglions lymphatiques, une pharyngite, des myalgies et potentiellement d'une perte de poids et des éruptions cutanées. Comme ces

symptômes sont indiscernables de ceux associés à bien d'autres infections virales aiguës, ils sont souvent considérés comme un syndrome grippal.

La phase de latence clinique:

Même sans traitement, le syndrome rétroviral aigu est suivi par une période asymptomatique prolongée de 8 ans en moyenne, pendant laquelle l'individu ignore la plupart du temps qu'il est infecté par le VIH-1. Néanmoins, la réplication virale durant cette période asymptomatique conduit à une inexorable perte progressive des lymphocytes T CD4+ ⁵².

La phase symptomatique : SIDA

Le diagnostic de SIDA est posé quand un individu infecté par le VIH développe des infections opportunistes ou des tumeurs. Aux Etats-Unis, le *Center for Disease Control and prevention* (CDC) a établi une liste de maladies référencées comme des évènements cliniques associées au syndrome d'immunodéficience⁵³. Cette liste, actualisée en 1993 mentionne qu'un patient a le SIDA quand il est infecté par le VIH, qu'il présente un nombre de lymphocytes T CD4+ inférieur à 200 cellules/mm³, ou qu'il est atteint d'un certain nombre de pathologies parmi lesquelles figurent les suivantes:

- ✓ Pneumonie à *Pneumocystis carinii*
- ✓ toxoplasmose
- ✓ méningite à cryptocoques
- ✓ candidose de l'oesophage

- ✓ infection disséminée par le cytomegalovirus
- ✓ infection disséminée par *Mycobacterium avium*,
- ✓ développement de certaines tumeurs comme le sarcome de Kaposi ou des lymphomes comme le lymphome de Burkitt.

(La liste complète peut être obtenue à l'adresse suivante:
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>)

III. Profils d'évolution particulière et de résistance naturelle au VIH

III.1 Patients non progressseurs à long terme (LTNP)

Le profil d'évolution clinique précédemment décrit concerne la plupart des patients infectés par le VIH-1. Cependant, un petit nombre de patients, considérés comme non progressseurs à long terme, maintiennent un nombre relativement normal et stable de lymphocytes T CD4⁺ et peuvent avoir des niveaux d'ARN viraux plasmatiques non détectables (chez les patients dits "*elite controllers*") même s'ils ne sont pas sous traitement^{54,55}. Certains d'entre eux ne présentent pas de signes de réplication du virus et restent naturellement asymptomatiques.

Un certain nombre de facteurs impliqués dans ce phénomène de résistance à l'infection par le VIH ont été identifiés chez ces patients:

- ✓ des facteurs virologiques (ex: infection par une souche virale atténuée)
- ✓ des facteurs immunologiques (ex: forte réponse des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques; anticorps neutralisants)
- ✓ et des facteurs génétiques de l'hôte (ex: mutation dans un corécepteur du VIH (CCR5-Δ32), avantage conféré par certaines molécules du CMH/HLA (Figure 12).

Fast progressors

HLA class I homozygosity, Ancestral haplotypes 8.1, 35.1, 44.2, A23, Supertype B7, B*08, Haplotype A*01-B*08-DR3, B22, B*35-Px, DR3, DR11

Slow progressors/long-term survivors

Supertype A2, B*27, B*51, B*57, B*1503, Supertype DR13, haplotype DRB1*13- DQB1*06

High-risk exposed HIV-seronegative individuals

A2, DR13

Figure 12 : Exemples d'association entre HLA et progression de la maladie liée au VIH-1²⁴ (Levy, 2009).

III.2. Personnes hautement exposées au virus et séronégatives (HEPS)

Aussi, il existe un autre groupe d'individus (prostituées, usagers de drogue par voie intraveineuse, enfants nés de mères infectées et sous allaitement maternel) qui malgré des expositions répétées au VIH-1 restent non infectés: les *Highly Exposed Persistently Seronegative* (HEPS)⁵⁶. Cette résistance apparaît dans certains cas liés aussi à des facteurs génétiques ou immunitaires (Figure 13).

Genetic

Reduced or lack of CCR5 expression
Genes closely related to HLA Class I A2 alleles

Immune

HIV-specific CD4⁺ T cells
HIV-specific CD8⁺ cell CTLs
CD8⁺ cell noncytotoxic anti-HIV response
Increased NK cell activity
Serum neutralizing antibodies against cellular components (e.g., HLA, CD4), not HIV
IgA antibodies in sera, saliva, and genital fluids that react to CCR5
Anti-HIV neutralizing IgA antibodies in genital fluids

Figure 13 : Observations sur des individus séronégatifs à expositions répétées au VIH-1²⁴ (Levy, 2009).

IV. La réponse immunitaire

IV.1. Généralités

L'immunité est la capacité d'un organisme à résister aux maladies notamment infectieuses. Le système immunitaire est constitué par un ensemble de cellules, de tissus, de molécules impliquées dans la résistance aux infections, soit en les prévenant, soit les éradiquant en cas d'infections déclarées. La réponse immunitaire est donc une série de réactions coordonnées de molécules et de cellules contre des germes pathogènes ou organismes étrangers.

Les mécanismes de défenses de l'hôte se composent d'une immunité naturelle, responsable de la protection initiale contre les infections, et de l'immunité adaptative, qui se développe plus lentement et met en œuvre une défense tardive et plus efficace contre les infections (Figure 14).

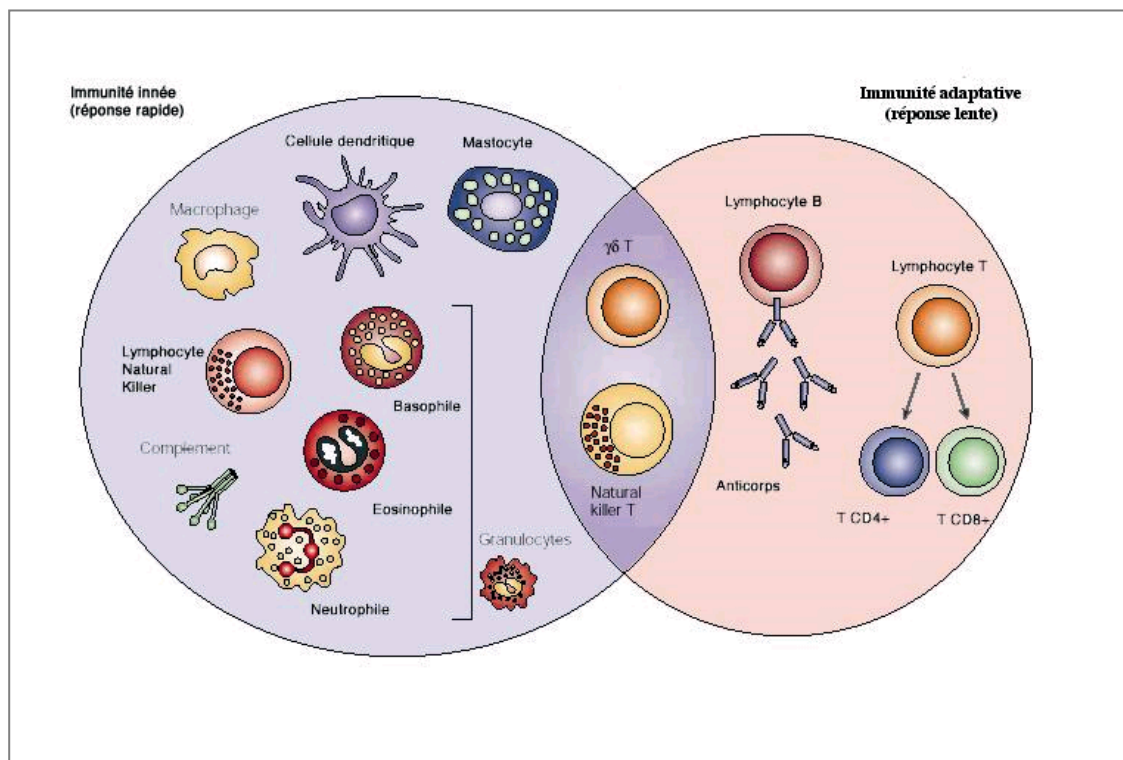


Figure 14 : Acteurs de la réponse immunitaire innée et acquise

L'**immunité innée** ou naturelle est un type de défense présent chez tous les individus sains, prêt à bloquer l'entrée de microbes et à éliminer rapidement ceux qui ont réussi à pénétrer dans les tissus de l'hôte. La première ligne de défense est constituée par les barrières épithéliales et par les cellules spécialisées ainsi que les antibiotiques naturellement présents dans les épithéliums. La fonction de tous ces éléments est de bloquer la pénétration des microbes. Cependant, quand ceux-ci parviennent à traverser la barrière épithéliale et à pénétrer dans les tissus ou dans la circulation sanguine, ils sont attaqués par les phagocytes, par des lymphocytes spécialisés appelés cellules tueuses ou NK (natural killer), et par diverses protéines plasmatiques comme celles du complément. Bien que l'immunité innée soit en mesure de combattre de manière efficace un grand nombre d'infection, les agents pathogènes pour l'homme ont évolué de façon à résister à l'immunité naturelle. La défense contre ces agents infectieux incombe alors à la réponse immunitaire adaptative.

L'**immunité adaptative** (Figure 15), acquise ou spécifique, est le type de défenses activées par l'invasion de microorganismes qui infiltrent les tissus de l'hôte. Elles sont capables de s'adapter à ceux-ci pour mieux les éliminer. Il existe deux types d'immunité adaptative : la réponse humorale et la réponse cellulaire. Elles font intervenir différents types de cellules et molécules et sont destinées à opposer une défense aux microbes extracellulaires ou intracellulaires.

Les acteurs de l'immunité humorale sont les anticorps, protéines produites par les lymphocytes B et secrétées dans les fluides produits par les muqueuses et dans la circulation sanguine. Ils neutralisent et éliminent les microbes et les toxines microbiennes présents dans le sang et dans la lumière des muqueuses, comme celle du

tractus gastro-intestinal ou respiratoire. Dans ces conditions, ils arrêtent les microbes à la surface des muqueuses et dans le sang et les empêchent d'accéder aux cellules et aux tissus conjonctifs de l'hôte et de les coloniser. Les anticorps préviennent ainsi les infections avant même qu'elles se déclarent. Cependant, ces molécules sont incapables d'atteindre des microbes qui vivent et se divisent à l'intérieur de cellules infectées. L'organisme utilise donc un autre moyen pour lutter contre ces microbes.

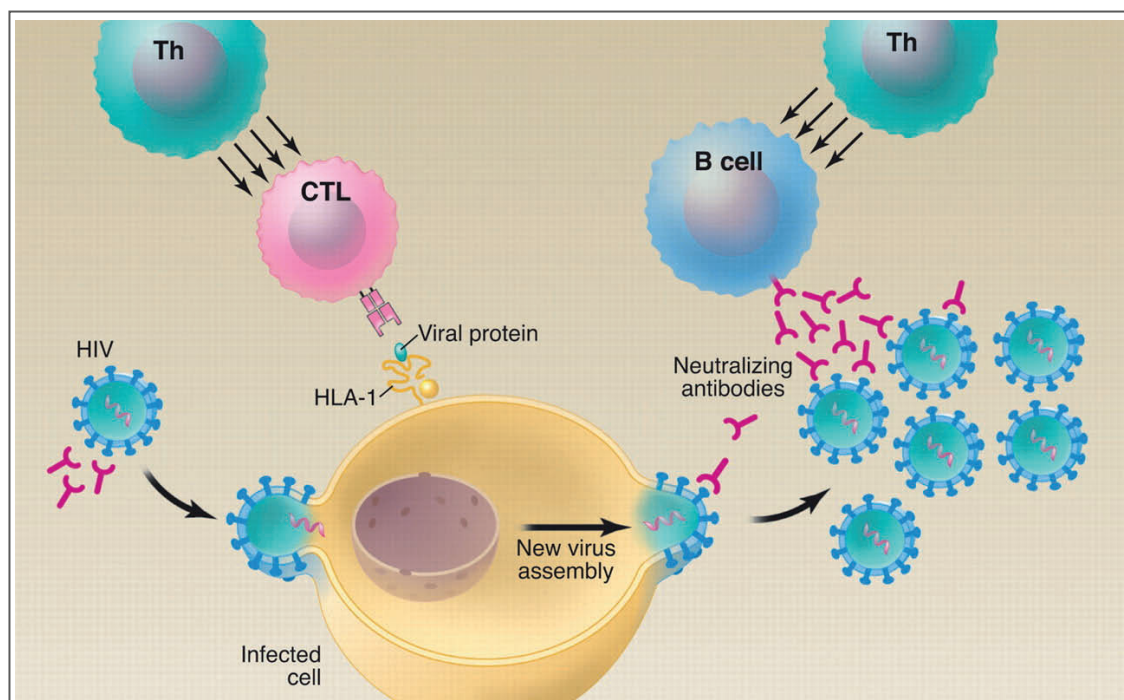


Figure 15: Réponse immunitaire adaptative contre l'infection par le VIH-1⁵⁷ (Walker et Burton, 2008).

L'infection des cellules par le VIH peut être évitée grâce aux anticorps qui peuvent neutraliser le virus libre avant que des provirus soient produits, neutraliser des virions nouvellement libérés des cellules infectées, ou agir contre les cellules infectées. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) agissent une fois que la cellule devient infectée. Ils reconnaissent grâce à leur TCR (récepteur de la cellule T) des épitopes (peptides issus de la dégradation des protéines virales, présentés à la surface de la cellule hôte par des molécules du HLA de classe I). La coordination des réponses cellulaire et humorale est assurée par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ou "helper" (Th)⁵⁷.

L'immunité cellulaire est le système de défense qui implique les lymphocytes T dans la lutte contre les microbes intracellulaires. Certains lymphocytes ont pour rôle de stimuler les phagocytes afin de détruire les agents pathogènes piégés dans les vacuoles de phagocytose. Si les anticorps produits par les lymphocytes B reconnaissent les antigènes extracellulaires, les lymphocytes T reconnaissent les antigènes produits par les microbes intracellulaires. La plupart des lymphocytes T ne reconnaissent que les antigènes de type peptidique alors que les anticorps sont capables de reconnaître un grand nombre de types différents de molécules microbiennes comme les peptides mais aussi les hydrates de carbone et les lipides.

L'immunité peut être induite chez un individu par une infection ou une vaccination (immunité active), ou conférée à un individu par transfert d'anticorps ou de lymphocytes (immunité passive) provenant d'un individu ayant subi une immunisation active.

IV.2. La réponse immunitaire contre le VIH-1 (Figure 16):

Les virions infectieux peuvent se présenter sous deux formes, en particules libres ou associés à une cellule, quand ils déclenchent la réponse immunitaire de l'hôte.

IV.2.1. La réponse innée à l'infection par le VIH-1

Les lectines de type C se liant au mannose (MBL) et le complément sont d'importants facteurs solubles de l'immunité innée qui peuvent induire l'inactivation du VIH^{58,59}. Aussi, des études ont montré l'importance des acteurs de la réponse

immunitaire innée (dont les cellules dendritiques et les cellules NK) et décrit les mécanismes impliqués dans le contrôle du VIH-1⁶¹⁻⁶³. Cependant, ceux-ci ne sont pas assez efficaces pour éradiquer le virus.

IV.2.2. La réponse adaptative à l'infection par le VIH-1

Le virus libre peut aussi être reconnu et neutralisé par des anticorps sécrétés naturellement par des cellules B à la surface des muqueuses comme les sIgA (Figure 16a)³¹. D'autres anticorps présents naturellement chez l'hôte peuvent prévenir l'entrée du VIH-1 dans les cellules comme les IgM anti-leucocytaires (auto-immunité), ou peuvent inhiber les effets de certaines protéines virales comme Tat (IgM anti-Tat).

De plus, des anticorps qui s'attachent (via gp120 ou gp41) au virus infectant une cellule sont aussi importants dans le sens où ils peuvent provoquer directement la mort de la cellule infectée; en effet, leur fixation sur les virions induit l'activation du processus connu sous le nom de cytotoxicité cellulaire dirigé par un anticorps (antibody-directed cellular cytotoxicity ou ADCC) qui aboutit à la mort cellulaire. En s'accrochant au récepteur Fc, ils activent des cellules immunitaires qui ont une activité anti virale (Figure 16b). Ce processus a été mis en évidence chez des patients infectés par le VIH-1, en bonnes conditions physiques, et corrélé avec une évolution clinique favorable⁶⁰.

Par ailleurs, le virus libre peut être capté par les cellules dendritiques (DC) et transféré à travers la surface muqueuse à l'épithélium sous muqueux où il peut infecter lymphocytes T CD4+ et macrophages (Figure 16a)³¹. Ces cellules (DC) jouent un rôle dans l'immunité innée et adaptative contre le VIH-1. Elles sont présentatrices d'antigènes (APC) aux lymphocytes B et aux lymphocytes T, et sont aussi capables de produire des cytokines⁶⁴.

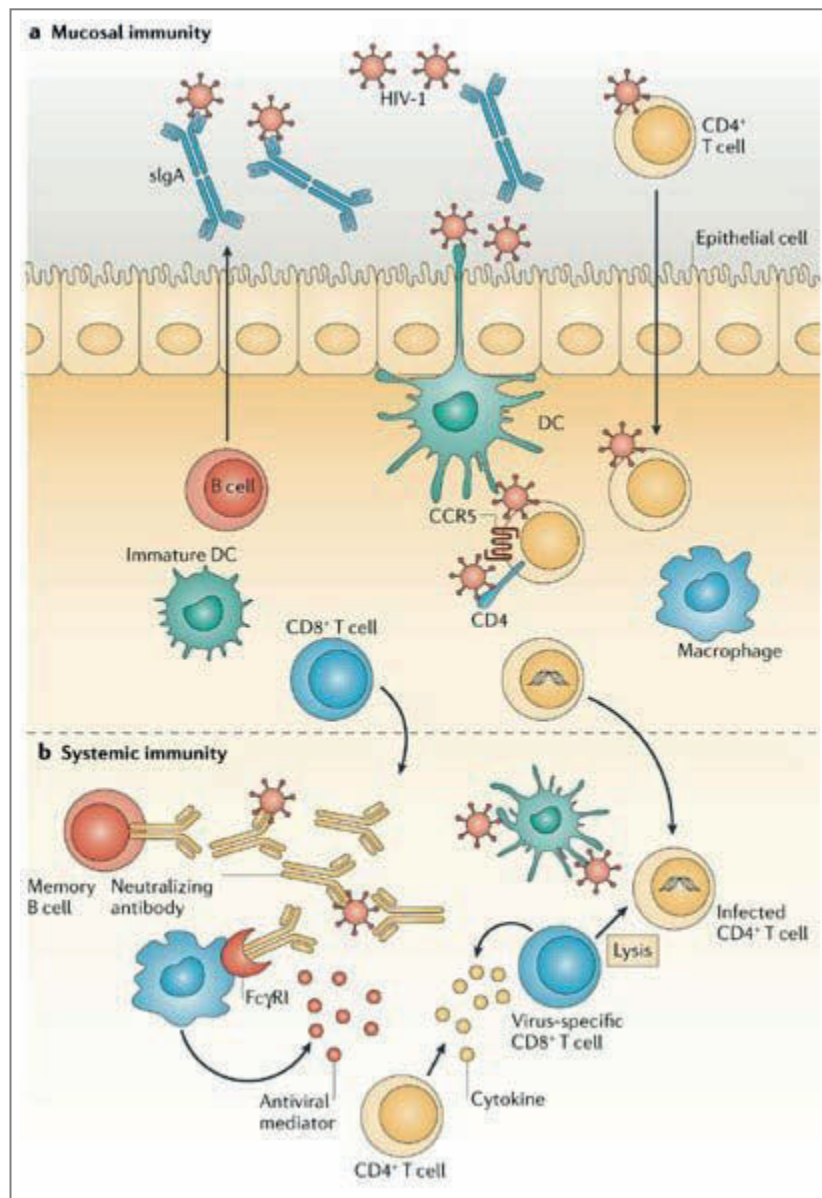


Figure 16 : Réponse immunitaire suivant l'infection par le VIH-1³¹ (Letvin, 2006).

IV.2.2.1. La réponse humorale

Les anticorps antiviraux ne semblent pas avoir un rôle central dans le contrôle de la propagation du virus en phase aiguë comme en phase chronique de l'infection par le VIH-1³¹. Plusieurs observations ont conduit à cette conclusion : bien que des anticorps neutralisants soient produits chez les individus infectés, cette réponse est faible et surtout émerge longtemps après le contrôle partiel de la réplication du virus qui est observé en phase aiguë de l'infection⁶⁵. De plus, des singes déplétés en cellules B et infectés ensuite avec le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) présentent une clairance normale du virus dans les premiers stades de l'infection⁶⁶.

Par ailleurs, il semble que la pression immunitaire induite par les anticorps conduise à la sélection de virus mutants qui ne sont pas neutralisés par les anticorps^{67,68}. Cependant, bien que ce processus d'échappement existe, il ne semble pas associé à une détérioration du point de vue clinique chez les individus infectés.

Finalement, chez l'homme, le traitement d'individus infectés, en phase chronique, avec des anticorps monoclonaux qui sont capables de neutraliser *in vitro* le VIH-1 a un très faible effet sur la réplication virale *in vivo*³¹. Ceci peut être la conséquence de l'incapacité des anticorps neutralisants à affecter les réservoirs de virus dans les cellules.

IV.2.2.2. La réponse cellulaire

Comme les anticorps neutralisants ont une contribution modeste à la clairance du virus, le contrôle immunitaire du VIH-1 dépendrait de la réponse cellulaire. Des études réalisées chez l'homme et chez le singe (modèle animal permettant notamment

d'étudier la phase précoce de l'infection) ont fourni diverses observations en phase primaire et chronique de l'infection qui supportent cette affirmation⁶⁹.

Les lymphocytes T CD4⁺ activés par la reconnaissance d'un antigène présenté par le HLA II jouent un rôle important dans l'immunité spécifique anti-VIH par la production de cytokines qui activent les lymphocytes B et T. La réponse des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au VIH-1, à elle seule ou associée à la réponse spécifique des lymphocytes T CD8⁺, assure un bon pronostic d'évolution clinique^{70,71}.

Comme les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD8⁺ peuvent avoir des fonctions dans la réponse immunitaire innée et acquise²⁴. Une réponse des lymphocytes T CD8⁺ antivirale non cytotoxique (CNAR), conduite par un nouveau facteur antiviral qui n'a pas encore été identifié (CAF, *Cell Antiviral Factor*), bloque la transcription du virus sans tuer la cellule infectée⁷².

Bien qu'il soit responsable d'une immunodéficience profonde, le VIH-1 stimule de fortes réponses immunitaires conduites par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques chez les individus infectés⁷³⁻⁷⁶. Dans la phase aiguë de l'infection, la réponse des lymphocytes T CD8⁺ suit initialement l'augmentation de la quantité de VIH-1 dans le sang. Le niveau de virus s'effondre quand la réponse des lymphocytes T CD8⁺ est maximale (Figure 17A). Après, il existe une relation inverse entre la réponse des lymphocytes T CD8⁺ et la charge virale⁷⁷. Des études ont montré que l'émergence d'une réponse des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus est associée de manière temporelle au contrôle précoce de la réplication du VIH-1 ou du VIS chez les individus infectés, et que des niveaux élevés de lymphocytes T CD8⁺ sont corrélés à de bons statuts cliniques chez des individus chroniquement infectés⁷⁷⁻⁷⁹. L'inhibition de la réplication du VIH-1 ou du VIS est réalisée directement par l'effet cytotoxique

des lymphocytes T CD8+ ou indirectement par leur production de médiateurs solubles antiviraux comme les chimiokines (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES qui se fixent au corécepteur du VIH-1 à la surface des lymphocytes T CD4+) ⁸⁰⁻⁸². Chez les singes rhésus, l'émergence des lymphocytes T CD8+ coïncide avec la clairance du virus dans la phase primaire de l'infection. A l'inverse, quand les singes sont démunis de lymphocytes T CD8+ par administration d'un anticorps monoclonal anti-CD8, la réplication du VIS n'est plus contrôlée et les animaux meurent après une maladie à progression rapide (Figure 17B) ⁸³⁻⁸⁵.

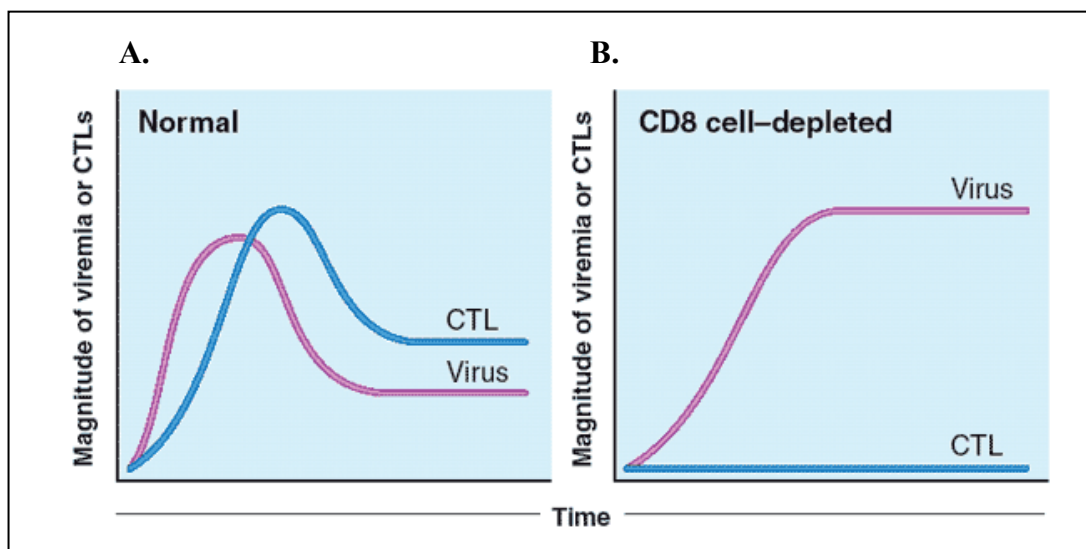


Figure 17 : Relation entre la réponse des CTL et la charge virale (Letvin et Walker, 2003). **A.** Un pic de virémie est observé chez le singe rhésus (modèle animal du SIDA) en phase aiguë de l'infection par le VIS. Les CTL parviennent à contenir partiellement le virus. **B.** Quand les CTL sont déplétés, le virus n'est plus contrôlé ⁸⁶.

Finalement, un certain nombre de lymphocytes T CD8+ dirigés contre les protéines de structure et de régulation du VIH-1 (Env, Gag, Pol, Nef, Tat) ont été identifiés chez des patients infectés dès la phase primaire de l'infection mais aussi en phase chronique^{76,87}.

Cependant, la pression exercée par les lymphocytes T CD8+ spécifiques des épitopes dominants conduit à la sélection de souches mutantes du VIH-1 chez l'Homme et du VIS chez le singe rhésus capables d'échapper à la reconnaissance de ces lymphocytes. L'émergence de ces mutants est associée de manière temporelle à une augmentation dramatique de la réplication virale et d'une détérioration clinique des individus infectés⁸⁸⁻⁹⁵.

Malgré toutes les stratégies utilisées par le système immunitaire de l'hôte pour contenir et/ou éradiquer le virus, la majorité des individus infectés sans traitement atteint la phase chronique de la maladie (à l'exception des groupes de LTNP et HEPS) et ce pour plusieurs raisons (Figure 19):

- le VIH-1 et le VIS sont capables de développer des mécanismes d'évitement (Figure 18),
- le système immunitaire peut présenter des faiblesses voire des dysfonctionnements liés à la présence du virus,
- l'hôte peut posséder des prédispositions génétiques.

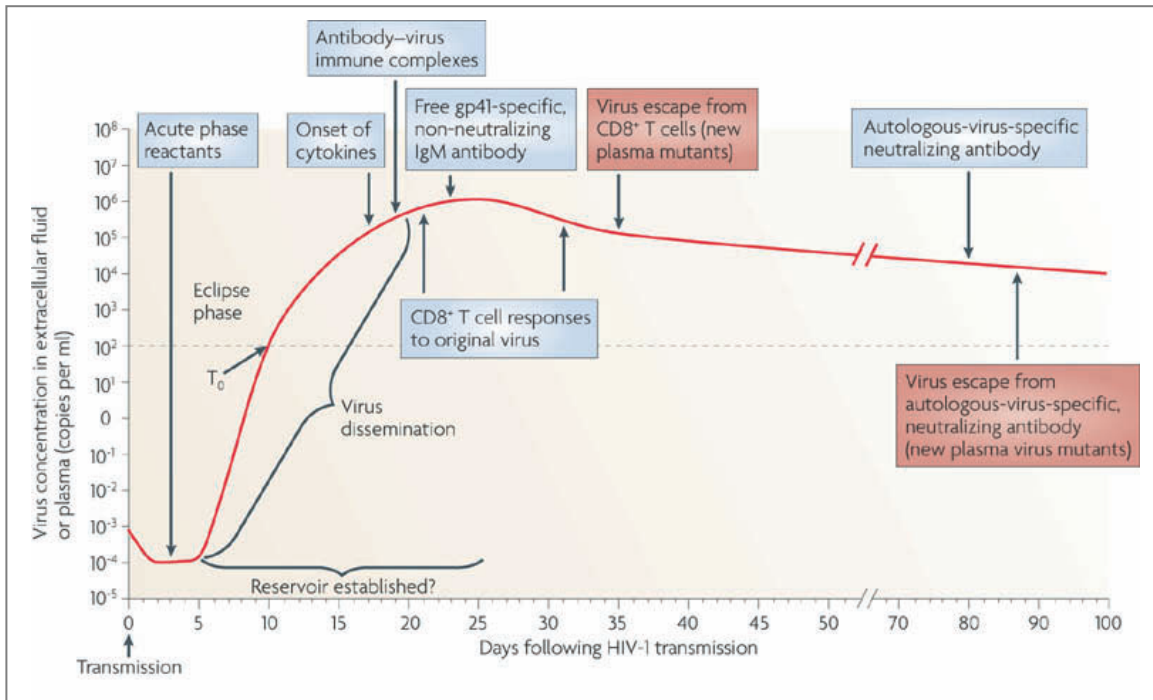


Figure 18 : Alignement composé des réponses immunitaires innée et adaptative les plus précoces détectées après infection par le VIH-1⁹⁶ (McMichael et al., 2010).

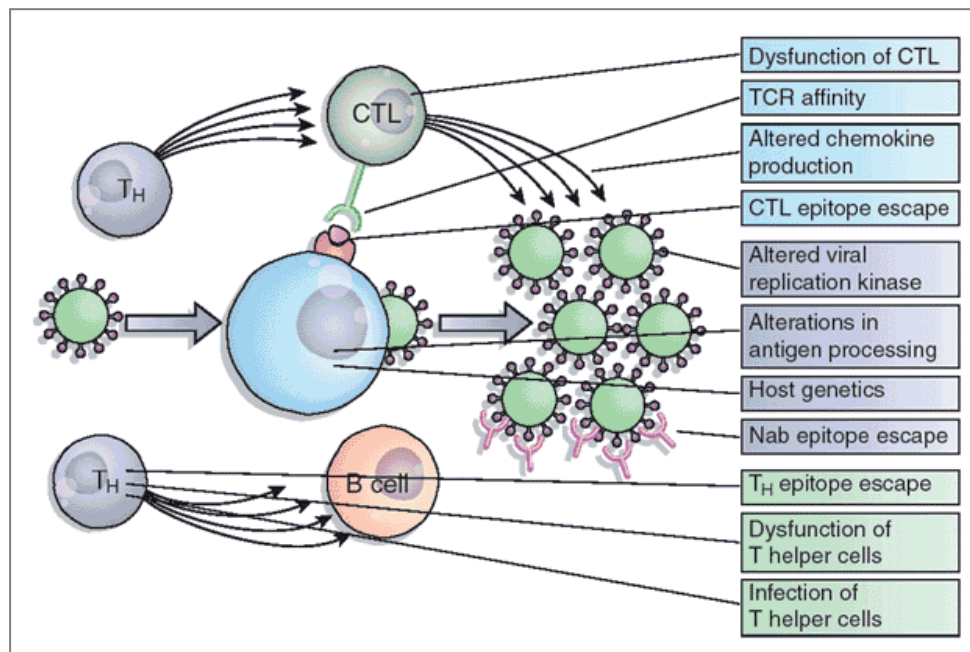


Figure 19 : Mécanismes potentiels de l'échec de la réponse immunitaire dans l'infection par le VIH-1⁸⁶ (Letvin et Walker, 2003).

Il est donc indispensable de mettre en place des traitements (thérapies antirétrovirales voire vaccinales).

V. Les traitements actuels

V.1. Thérapies antirétrovirales

Selon le guide pour l'utilisation des agents antirétroviraux comme traitement des adultes et des adolescents infectés par le VIH-1 (disponible à l'adresse suivante <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>), il existe actuellement une vingtaine de drogues antirétrovirales qui ont été approuvées dans le traitement de l'infection par le VIH-1. Différentes classes d'antirétroviraux sont disponibles. Ils agissent à différents niveaux pour limiter l'infection par le VIH-1 (Figure 20):

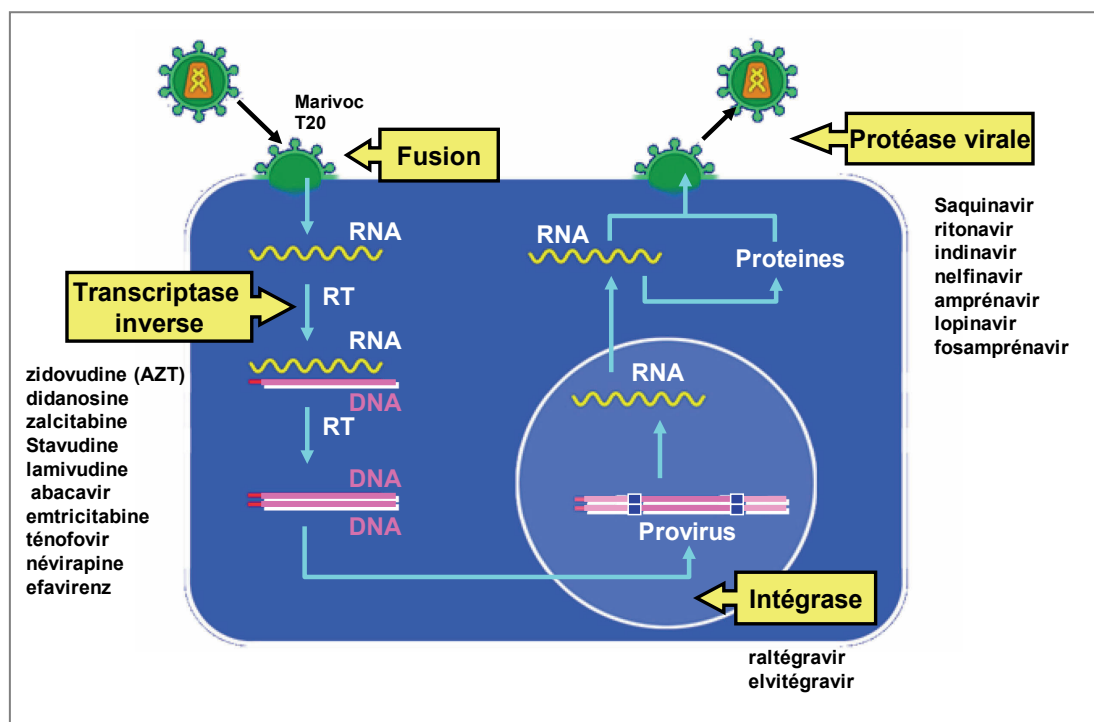


Figure 20: Différentes classes d'antirétroviraux utilisés comme traitement dans l'infection du VIH-1 (diapositive 14, présentation 1115-05-OMS-TB-VIH.ppt: Prise en charge clinique du VIH/SIDA document No. 6.3). Chacune de ces classes de médicament affecte le virus à différents stades de son cycle de réplication.

a) Les inhibiteurs de la transcriptase inverse :

- **NRTI**, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor : reconnus comme des nucléotides, ils sont incorporés à l'ADN par la transcriptase inverse, ce qui induit l'arrêt de la synthèse du provirus. L'exemple le plus connu de ce type d'inhibiteurs est l'**AZT** ou Zidovudine® qui est la première molécule anti VIH-1 mise sur le marché en 1987.

- **NNRTI**, Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (Névirapine; Efavirenz) : ce sont des inhibiteurs non compétitifs de la transcriptase inverse.

b) Les inhibiteurs de la protéase virale (Ritonavir; Indinavir) : ce sont des analogues du peptide de liaison qui se lient au niveau du site actif de la protéase. Ainsi, ils inhibent le découpage et l'assemblage des protéines virales, processus indispensable dans la constitution de virus infectieux.

c) Les inhibiteurs de l'intégrase (Raltegravir; Elvitegravir) : Ils bloquent l'action de l'intégrase et empêchent ainsi l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte.

d) Les antagonistes de CCR5 : Ils interviennent au début du cycle de réplication du VIH-1 en perturbant l'interaction de ses protéines de surface avec leur corécepteur exprimé par les cellules cibles. Le Marivoc est une molécule qui bloque l'interaction

entre CCR5 et la protéine virale gp120, inhibant ainsi l'infection par les souches virales R5.

e) **Les inhibiteurs de fusion** : Ils interviennent aussi au début du cycle de réplication du VIH-1 en bloquant les protéines de surface du virus. Le T20 inhibe directement la fusion des membranes du virus et de la cellule cible en bloquant les changements conformationnels de la protéine gp41, préalablement nécessaires à la réalisation de la fusion.

Dans les années 1980, les traitements contre le VIH-1 étaient essentiellement des monothérapies basées sur l'action d'un inhibiteur de la transcriptase inverse, comme l'AZT, pour réduire la charge virale chez le patient infecté. Cependant, l'utilisation de ces médicaments comme seuls agents thérapeutiques a été associée à une modeste prolongation de la vie des patients atteints de SIDA. Par ailleurs, le VIH-1 a développé rapidement des mutations pour limiter voire annihiler l'action de ces monothérapies, et des souches mutantes résistantes aux molécules utilisées dans ces monothérapies se sont développées.

Dans les années 1990, d'autres classes d'antirétroviraux comme les inhibiteurs de protéase, les NNRTI, et plus tard, les inhibiteurs de l'intégrase, les inhibiteurs de fusion, et les antagonistes de CCR5 ont été développés. L'effet antiviral de ces différents types d'antirétroviraux utilisés en combinaison est significativement supérieur à celui obtenu par monothérapie. Les trithérapies, généralement composées d'inhibiteurs de la transcriptase associés à un inhibiteur de la protéase, ont permis de diminuer rapidement la charge virale jusqu'à atteindre des taux d'ARN viraux indétectables chez les patients sous ce type de traitement. Par ailleurs, l'utilisation de

ces différentes classes de molécules en thérapies combinées connues sous le nom de Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), a dramatiquement ralenti l'émergence de virus mutants résistants aux traitements^{97,98}. Aussi, à la fin des années 1990, la mortalité due à l'infection par le VIH-1 a baissé de 60 à 80% chez les patients sous HAART⁹⁹.

Malgré les avancées considérables dans le traitement des infections du VIH-1, le problème majeur de l'épidémie mondiale du SIDA n'est pas résolu. Si ces thérapies conduisent à une baisse de la réplication au point que le virus n'est plus détectable chez les patients sous HAART, elles ne permettent pas l'éradication du virus. En effet, des réservoirs de virus capables de se répliquer ont aussi été observés chez des patients traités avec succès par des antirétroviraux¹⁰⁰. Par ailleurs, l'interruption du traitement chez les patients où le virus n'est plus détecté conduit à un dramatique rebond de la réplication^{101,102}.

D'autres facteurs limitent également l'impact de ces thérapies sur l'épidémie de SIDA:

- Les antirétroviraux sont souvent associés à une certaine toxicité à l'origine d'effets indésirables,
- l'émergence de virus mutants résistants aux traitements,
- l'accès limité de ces traitements coûteux aux pays en voie de développement sévèrement touchés par l'épidémie mais qui ne peuvent pas supporter la charge économique de ces thérapies.

Dans ce contexte, le développement d'un vaccin "sûr", sans danger, et efficace contre le VIH-1 semble être indubitablement la meilleure solution pour contrôler la pandémie mondiale de SIDA.

V.2. Diverses stratégies vaccinales contre le VIH-1

Depuis la découverte du virus, de nombreuses stratégies ont été développées dans le but de mettre au point un vaccin idéal contre VIH-1. Les caractéristiques principales de ce vaccin seraient les suivantes :

- ✓ La capacité de prévenir toute transmission du virus par voies muqueuse ou parentérale
- ✓ Un excellent profil du point de vue de l'innocuité
- ✓ Une simple dose administrée
- ✓ Un effet à long terme qui confère une protection plusieurs années après vaccination
- ✓ Un coût limité
- ✓ Une certaine stabilité selon différentes conditions
- ✓ Facile à transporter et à administrer
- ✓ La capacité d'induire une protection contre l'infection par des virus divergents, prévenant ainsi le besoin de vaccins spécifiques à de nombreuses formes de VIH-1.

L'objectif des prochains paragraphes est de dresser l'état de l'art au moment où j'ai commencé ma thèse (Septembre 2006).

Différentes stratégies vaccinales contre le VIH-1 ont été testées préalablement dans un modèle animal avant d'être testées chez l'Homme. La première génération de candidats vaccins anti-VIH s'est développée à la fin des années 1980. Au départ, les développements et essais de vaccins anti-VIH se sont faits de manière totalement

empirique, en cherchant à appliquer les stratégies vaccinales qui avaient fait leurs preuves dans la prévention d'autres infections virales (Tableau 1 et Figure 21).

| Type de vaccin | Avantages | Inconvénients | Evolution actuelle | Stade de développement |
|---|--|---|---|--|
| Virus atténué | Reproduit l'infection naturelle | Virulence résiduelle, possibilité de retour à la virulence, persistance du virus dans l'organisme | Abandonné | |
| Virus inactivé | Présentation des protéines structurales sous forme native | Sécurité débattue, dénaturation de la gp120 par le formol | Seconde génération | Préclinique (phase II pour le virus sans gp120: Remune) Phase I |
| Pseudo-virions (<i>virus-like particles</i> : VLP) | Présentation des antigènes Env dans une conformation naturelle | Difficile à produire, coût élevé | Nouveau procédé de fabrication | Phase I |
| Protéines sous-unitaires recombinantes | Simple, facile à préparer | Pas de stimulation de réponses CD8+, perte fréquente des épitopes tridimensionnels | Utilisation de nouveaux adjuvants | Phase III Ex. : gp120 Vaxgen |
| Peptides | Simple, facile à préparer (synthèse chimique) | Limité en termes d'épitopes présentés, immunogénicité faible | Seconde génération, poly-épitopes, immunodominance | Phase I Ex. lipopeptides |
| Vecteurs bactériens recombinants | Facile à préparer, coût raisonnable, stimulation de l'immunité cellulaire | Capacité de clonage variable, instabilité, immunité pré-existante potentielle (<i>Salmonella</i> , BCG) | Création de nouveaux vecteurs plus stables | Phase I |
| Vecteurs viraux recombinants | Large choix disponible Stimulation de l'immunité cellulaire, maîtrise de la production industrielle | Capacité de clonage limitée (sauf Pox), instabilité génétique, immunité anti-vecteur potentielle (adénovirus, rougeole) | Utilisation de nouveaux sérotypes viraux (ex. adénovirus simiens), utilisation de plusieurs vecteurs successifs | Phase I-II |
| ADN plasmidiques | Facile à produire, utilisation en combinaison <i>prime-boost</i> | Immunogénicité limitée chez l'homme, nécessité de fortes doses, nécessité de rappels hétérologues | Amélioration de la formulation et de la composition nucléotidique (optimisation des codons), adjuvants | Phase I-II |

Tableau I : Stratégies vaccinales contre le VIH-1¹⁰³ (Girard et Verrier, 2006).

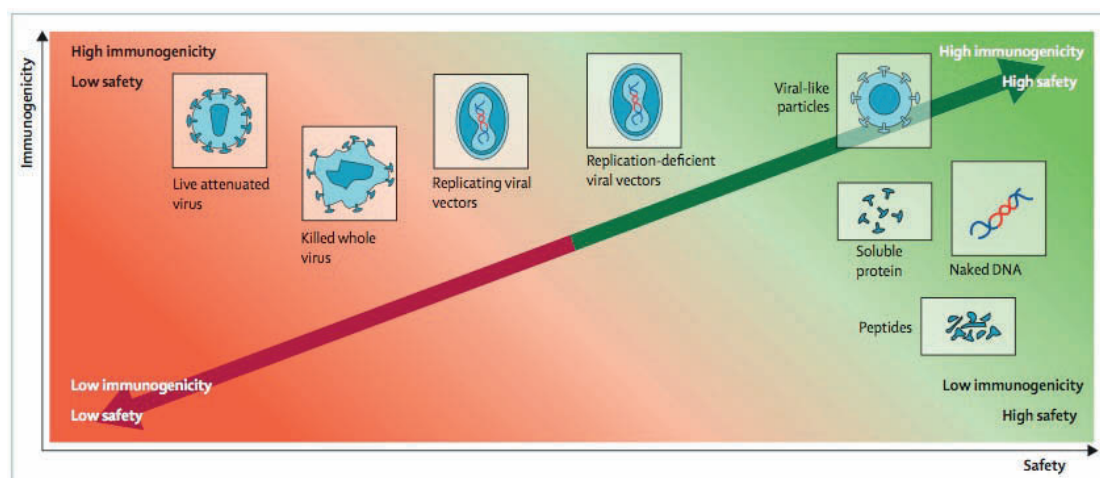


Figure 21: Immunogénicité/sécurité des différentes stratégies vaccinales contre le VIH-1¹⁰⁴ (Ross et al., 2010).

La piste du vaccin utilisant un virus vivant atténué, qui a prouvé son efficacité en protégeant contre les maladies de l'enfance a ainsi été explorée chez le singe. Dans ce modèle, le génome du VIS délété de la séquence relative à Nef a été utilisé pour vacciner des singes rhésus adultes. Ce vaccin conférait une substantielle protection contre l'infection par le VIS¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ mais s'est avéré trop dangereux pour que la même stratégie soit testée chez l'Homme avec le VIH-1. En effet, l'infection de jeunes singes par un VIS Δ nef a été létale^{108,109} car ces virus sont capables de réparer leur délétions *in vivo* dès les premières semaines suivant leur administration¹¹⁰.

Les vaccins utilisant des souches virales totalement inactivées, comme ceux utilisés pour immuniser contre influenza et contre l'agent de l'hépatite A, ainsi que les vaccins utilisant des protéines sous-unitaires recombinantes comme ceux pour prévenir l'hépatite B, se sont avérés être inefficaces contre le VIH-1¹¹¹. En fait, les techniques d'inactivation du virus pouvaient endommager des structures reconnues par les anticorps. En 1998, un vaccin (AIDSVAX) utilisant la sous-unité gp120 a été le premier à être soumis à des essais cliniques en phase III chez l'homme, par VaxGen. Ce vaccin sans danger élicitait une forte réponse avec des anticorps neutralisants spécifiques de souches homologues du virus mais qui n'étaient pas efficaces contre diverses souches du VIH-1. Par ailleurs, ce type d'immunogènes s'est montré incapable d'induire la présentation des antigènes aux molécules du CMH de classe I et donc n'induisait pas de réponse efficace des lymphocytes T CD8+^{112,113}. En 2003, Vaxgen a donc annoncé que des vaccins utilisant la gp 120 étaient non protecteurs du VIH-1¹¹⁴.

L'effort s'est alors porté sur une seconde génération de vaccins dont le but était d'induire une réponse cellulaire des lymphocytes T CD8+ en utilisant différents types d'immunogènes et différents types de vecteurs. La plupart des vaccins anti-VIH sont à

base d'antigènes viraux ou de peptides administrés tels quels, ou sous leur forme nucléotidique correspondante exprimée par un vecteur *ad hoc*. Ainsi, trois types de vaccins ont été majoritairement développés:

- les vaccins à base d'ADN plasmidique,
- les vaccins vivants recombinants à base de vecteurs viraux ou bactériens atténués,
- et les lipopeptides.

Des approches basées sur l'utilisation de peptides synthétiques homologues d'épitope du VIH ont été développées. Les peptides administrés sans adjuvants se sont avérés insuffisamment immunogéniques. Cependant, leur association à des molécules lipidiques (lipopeptides) a facilité l'induction d'une réponse des lymphocytes T CD8+. Finalement, plusieurs petits peptides provenant de diverses formes d'un même épitope peuvent être combinés et servir d'immunogènes dans le but d'élargir la réponse contre différents isolats du VIH-1¹¹⁵.

De nombreuses études réalisées chez le modèle singe rhésus ont montré que la plupart des candidats vaccins prometteurs capables d'induire de fortes réponses immunitaires cellulaires étaient ceux associés aux adénovirus recombinants, au pox virus et aux ADN plasmidiques. D'inoffensifs ADN plasmidiques de bactéries sont utilisés pour exprimer des séquences nucléotidiques relatives au VIH. Ces plasmides peuvent être injectés dans le muscle ou dans la peau. Les séquences d'ADN relatives à l'enveloppe (Env), à des protéines de la matrice (Gag) et à la polymérase virale (Pol) ont été massivement utilisées comme immunogènes dans ce types de vaccins¹¹⁶⁻¹¹⁸. Parce que les vaccins à ADN plasmidique élicitent les réponses des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques ainsi que celles des lymphocytes T CD4+ auxiliaires, et qu'ils

peuvent être administrés de manière répétée sans perdre leur immunogénicité, beaucoup considèrent que ces vaccins sont de bons candidats¹¹⁹⁻¹²¹. Cependant, employés seuls, ces vaccins se sont avérés peu immunogènes chez les primates, ce qui a conduit au développement de stratégies combinées "prime boost" qui associent une primo-vaccination assurée par un ADN plasmidique et un rappel impliquant des vecteurs viraux de type poxvirus ou adénovirus recombinants¹²²⁻¹²⁴. Parmi les poxvirus, un des plus utilisés est la souche atténuée MVA (modified virus Ankara) du virus de la vaccine^{125,126} et parmi les adénovirus, le sérotype 5 (Ad5)^{127,128}. Ce type de stratégie vaccinale parvient à induire une réponse cellulaire importante de lymphocytes T CD8+ chez le rhésus macaque^{127,129-133}. Cependant, les animaux testés ne sont pas protégés contre l'infection par la souche pathogène chimérique SHIV (virus hybride SIV/HIV dont les gènes Env, Tat et Rev sont ceux du VIH) mais réussissent à contrôler rapidement la réplication du virus et leur charge virale. Par ailleurs, la baisse du nombre de leurs lymphocytes T CD4+ est significativement retardée et la durée de vie des animaux en est aussi prolongée. Girard et Verrier dans leur revue "Vaccins préventifs anti-VIH/SIDA" parue en 2006 parlaient alors d'un nouveau concept de vaccins antiviraux, capables non pas d'empêcher l'infection mais d'en atténuer les conséquences cliniques en contrôlant le virus¹⁰³.

Chez l'homme, les premiers vaccins candidats vivants recombinants construits avec des poxvirus comme vecteurs, utilisés seuls, s'étaient aussi avérés incapables d'induire des réponses des lymphocytes T CD8+ de grande amplitude ou de durée prolongée. Dans des essais cliniques de phase II aux Etats-Unis, l'Alvac-VIH a induit la production d'interféron γ par les lymphocytes T CD8+ chez seulement 25% volontaires testés, quand dans une autre étude clinique réalisée au Royaume Unis et au Kenya un vaccin utilisant MVA comme vecteur n'induisait cette réponse que chez

10% des individus testés^{114,134-136}. Le pouvoir immunogène de ces vaccins s'est amélioré en les utilisant comme rappel dans des stratégies prime-boost, après une primo-vaccination assurée par un ADN plasmidique.

D'autres approches pour augmenter l'efficacité des vaccins à ADN ont été développées : l'utilisation d'adjuvants conventionnels ou issus du génie génétique, l'usage de microsphères, et l'électroporation *in vivo*^{137,138}.

Un très grand nombre d'essais cliniques de vaccins contre le VIH-1 a déjà eu lieu depuis la fin des années 1980, avec près de 50 études cliniques initiées. Un échantillon est présenté dans le Tableau II. Les plus avancés parmi ceux-ci sont ceux testant des vaccins recombinants utilisant comme vecteurs, le virus de la variole du canari ou l'adénovirus de sérotype 5.

- le RV144 est une étude d'essais cliniques en phase III initiée en Thaïlande. Elle teste l'efficacité d'un vaccin qui utilise le virus de la variole du canari comme vecteur exprimant env/gag/pol dans l'ALVAC-VIH de Sanofi-Pasteur. Il est utilisé en primo-immunisation. Celle-ci est suivie d'un rappel avec la gp120 de VaxGen. En fait, le but de ce vaccin recombinant était de combiner des immunogènes désignés pour induire une réponse cellulaire (induite par l'ALVAC) et une réponse humorale (induite par la gp120) pour prévenir l'infection et/ou contrôler la réplication du VIH-1 après infection. A l'époque, son lancement avait soulevé une polémique car, des essais cliniques en phase I et II avaient montrés que l'ALVAC était peu immunogénique¹¹⁴. Aussi, d'autres essais cliniques en phase III avait montré qu'un vaccin à base de gp120 était incapable de prévenir l'infection du VIH-1¹³⁴⁻¹³⁶.

| Vaccine | Immunogen | Clade | Sponsor | Country | Phase |
|------------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------|------------------------|-------|
| AIDSVAX B/E | gp120 | B, E | VaxGen | Thailand | 3 |
| AIDSVAX B/B | gp120 | B | VaxGen | USA | 3 |
| ALVAC vCP1452 | Env-Gag-Pol-CTL | B | NIAID | USA | 2b |
| AIDSVAX B/B | gp120 | B | | | |
| ALVAC vCP1452 | Env-Gag-Pol-CTL | B | NIAID | Brazil, Haiti, Peru | 2b |
| AIDSVAX B/B | gp120 | B | | Trinidad & Tobago | |
| DNA.HIVA | Gag-CTL | A | IAVI/MRC | UK | 2a |
| MVA.HIVA | Gag-CTL | A | | Uganda | |
| ALVAC vCP205 or vCP1452 | Env-Gag-Pol-CTL | B | NIAID | USA | 2a |
| AIDSVAX B/B | gp120 | B | | | |
| ALVAC vCP205 | Env-Gag-Pol | B | WRAIR | USA | 1 |
| ALVAC vCP1452 | Env-Gag-Pol-CTL | B | NIAID | USA | 1 |
| DNA.HIVA | Gag-CTL | A | IAVI/MRC | Kenya | 1 |
| MVA.HIVA | Gag-CTL | A | | | |
| MRKAd5 | Gag | B | Merck | USA | 1 |
| Poly-env1 vaccinia | Env | A, B, C D, E | St Jude's | USA | 1 |
| VCR-HIVDNA009-99-VP | Env Gag-Pol-Nef | A, B, C B | NIAID/VRC | USA | 1 |
| GTU-Nef DNA | Nef | B | FIT Biotech | Finland | 1 |
| VCR4302 DNA | Gag-Pol | B | NIAID/VRC | USA | 1 |
| Gag DNA | Gag | B | Merck | USA | 1 |
| PGA2/JS2 DNA | Gag, RT, Env, Tat, Rev, Vpu | B | NIAID | USA | 1 |
| NefTat fusion/gp120 | Nef-Tat, gp120 | B | NIAID | USA | 1 |
| LIPO-4T lipopeptide | Gag-Pol-Nef-TT-CD4 | B | ANRS | France | 1 |
| ALVAC vCP1452 | Env-Gag-Pol-CTL | B | ANRS/Aventis | France | 1 |
| LIPO-5T or LIPO- 6T lipopeptide | Gag-Pol-Nef-TT-CD4 | B | | | |

All trials are being conducted in HIV-negative volunteers at either low risk (phases 1 and 2a) or high risk (phases 2b or 3). CTL denotes CTL epitopes. CD4 denotes T-helper epitopes. ANRS, National Agency for AIDS Research; IAVI, International AIDS Vaccine Initiative; MRC, Medical Research Council of the United Kingdom; NIAID, National Institute for Allergy and Infectious Diseases; VRC, Vaccine Research Center; WRAIR, Walter Reed Army Institute of Research. Table adapted from the International AIDS Vaccine Initiative website (<http://www.iavi.org>).

Tableau II: Vaccins prophylactiques contre le VIH-1 en cours d'essais cliniques¹¹³ (McMichael et Hanke, 2003).

Des vaccins à adénovirus non répliquatif de sérotype 5 (Ad5) sont développés d'une part par Merck, et d'autre part par le Vaccine Research Center (VRC) du National Institute of Health (NIH) aux Etats-Unis.

- STEP est le nom de l'étude de phase II conduite par Merck qui avait pour but de tester l'efficacité protectrice d'un vaccin à base des séquences Gag/Pol/Nef d'un VIH-1 de clade B exprimées par Ad5. La réserve par rapport à l'efficacité des vaccins recombinants à base d'Ad5 se porte sur l'existence d'une forte immunité anti-vecteur dans la population humaine. En effet, la prévalence des anticorps anti-Ad5 est de 30 à 50% dans les pays industrialisés et atteint 60 à 90% dans les pays en développement¹³⁹. Pour contourner cette difficulté, une nouvelle gamme de vaccins recombinants à base d'autres stéréotypes d'adénovirus comme Ad26 a été proposée.

D'autres problèmes sont à envisager, comme celui lié à l'émergence de virus mutants sous la pression de la réponse immunitaire induite par l'immunisation pouvant conduire à l'échappement du virus et donc à l'échec de la vaccination. En effet, des singes rhésus vaccinés (ADN plasmidique -Env/gag +IL-2) et infectés par le virus chimérique SHIV89.6P présentaient de fortes réponses cellulaires, maintenaient le contrôle de la réplication du virus de manière durable, et ne présentaient aucun signe cliniques de progression vers la phase SIDA 140 jours après infection¹⁴⁰. Cependant, si 7 singes sur 8 ont continué à contrôler la réplication du virus, ont maintenu leur nombre de lymphocytes T CD4+ à des niveaux corrects et un statut clinique stable jusqu'à deux ans après infection, un des singes n'a plus été capable de contrôler sa virémie dès la 24ème semaine post-infection (p.i), présentait une perte massive de lymphocytes T CD4+ (semaine 36 p.i), entrant en phase symptomatique de

la maladie (semaine 44 p.i) et décédait du SIDA 52 semaines après infection. Chez ce singe, une mutation a été identifiée dans l'épitope de Gag. Cet épitope est immunodominant, dans le sens où il induit une des plus fortes réponses des lymphocytes T CD8+ comparée à celle induite par des épitopes relatifs à l'enveloppe du virus ou à la polymérase¹⁴¹⁻¹⁴³. Cette mutation a conduit à la non reconnaissance du virus par les lymphocytes T CD8+, à une augmentation rapide de sa réplication et à l'échec de la vaccination¹⁴⁴. Des mutations dans des épitopes, relatifs à d'autres protéines comme Nef, ont été associées à l'échec de la vaccination chez le singe¹⁴⁵. Le problème de l'échappement du virus du à l'émergence de mutants constitue donc une limitation majeure dans la réalisation de vaccins efficaces contre le SIDA^{146,147}.

Du vaccin "simple clade à la mosaïque":

Pour répondre à la diversité naturelle du VIH-1 et à l'émergence de mutants liée à la pression de la réponse immunitaire, des vaccins de plus en plus complexes ont été testés chez les singes dans l'idée d'augmenter leur potentiel à reconnaître de manière croisée différents isolats du virus: au départ les vaccins testés utilisaient une souche du VIH-1 comme immunogène. Beaucoup de vaccins ont été construits avec des séquences relatives au clade B (de env, gag, pol, nef, tat, rev) ou du clade C. Puis avec les stratégies "prime-boost", les combinaisons d'immunogènes relatifs à plusieurs sous-types du VIH-1 ont été proposées, comme l'association des clades B et AE, les formes majoritaires observées dans la population thaïlandaise (testée dans le RV144). Aussi, le Vaccine Research Center du National Institutes of Health aux Etats-Unis a inclus trois constructions codantes pour les protéines de l'enveloppe des clades A, B et C du VIH-1. L'évaluation immunologique de ce vaccin multiclade chez le singe rhésus a montré qu'il était capable d'induire une réponse humorale et cellulaire¹⁴⁸. Comparé à des vaccins constitués par un seul de ces mêmes clades, le vaccin

multiclade induit une réponse plus large. Cependant, aucun effet synergique n'a été observé. Des essais cliniques de ce vaccin ont débuté chez l'Homme en Septembre 2005.

Récemment, le niveau de complexité maximale a été notamment proposé par l'équipe de Bette Korber (Los Alamos National Laboratory) avec comme immunogène une séquence mosaïque obtenue par une méthode informatique¹⁴⁹. Prenons l'exemple de l'enveloppe du virus: Le programme informatique combine la séquence de chaque clade de l'enveloppe en une séquence "mosaïque" qui permet d'obtenir l'expression et le processing d'un maximum de variants d'un même épitope relatif à l'enveloppe de différents clades du VIH-1. Ainsi, ces épitopes qui varient d'un ou plusieurs acides aminés sont présentés aux lymphocytes T CD8+ et leur reconnaissance pourrait alors induire une réponse immunitaire contre différents isolats du virus, voire limiter l'échappement de souches virales mutantes émergentes.

Finalement, d'autres méthodes informatiques ont permis d'identifier des séquences nucléotidiques communes aux formes divergentes du VIH-1 dans le but de les incorporer dans des vaccins anti-VIH¹⁵⁰⁻¹⁵². Ainsi, des séquences consensus ont été définies comme étant des séquences ancestrales communes aux différents isolats observés dans le monde. Des vaccins qui utilisent des séquences consensus relatives à l'enveloppe du VIH-1 comme immunogènes ont prouvé leur efficacité dans des tests réalisés *in vitro*¹⁵³. Il reste à déterminer si ce type d'immunogènes élicite une réponse plus large que les vaccins qui utilisent une simple forme d'un gène viral.

CHAPITRE 3

Diversité clonale des lymphocytes T CD8+ générés après immunisations ou infection par le VIH-1

L'utilisation de méthodes standardisées dans l'étude des réponses immunitaires liées à l'infection par le VIH-1 ou générées par immunisations est primordiale afin de pouvoir comparer des études réalisées par différents laboratoires, sur différentes cohortes dans le monde. En 2004, la conférence "Measurement of Antigen-Specific Immune Response" (MASIR) réunissait des chercheurs de différentes disciplines liées à l'immunobiologie pour discuter des meilleures techniques utilisées pour mesurer la réponse immunitaire cellulaire spécifique du VIH notamment chez des personnes vaccinées. L'ensemble de ces techniques est rapporté par McDermott et Cohen dans un rapport de l' *International AIDS Vaccine Initiative* (IAVI) d'Avril 2005¹⁵⁴.

De nombreuses études évaluent la réponse immunitaire liée à une infection par le VIS ou le VIH-1, ou générée par divers types d'immunisations contre ces virus, en mesurant le pourcentage de lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître *in vitro* des épitopes provenant de la dégradation de différentes protéines virales^{70,75-77,84,96,155-161}. De plus, l'activité de ces populations est majoritairement évaluée par des tests ELISpot-IFN- γ en stimulant des cellules mononuclées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells ou PBMC) par des pools de peptides qui couvrent l'ensemble de la séquence d'une protéine virale plutôt qu'un épitope particulier^{154,162,163}. Aussi, le nombre de lymphocytes T CD4+ et leur activité peuvent

être suivis parallèlement à la mesure de la charge virale chez les individus infectés préalablement vaccinés ou non^{51,70,164,165}.

Cependant, si de nombreuses publications démontrent le rôle essentiel des lymphocytes T CD8+ dans le contrôle du VIH ou du SIV, peu d'études identifient la partie du récepteur du lymphocyte T CD8+ (TCR) impliquée dans la reconnaissance de nombreux épitopes provenant de diverses formes du virus.

I. Modèle animal et SIDA

Un modèle animal est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes de la pathogenèse du SIDA. En effet, le VIH-1 étant un lentivirus, le moment où l'infection par ce virus devient symptomatique chez l'homme est bien trop "tardif" pour permettre d'étudier les phases précoces de l'infection.

Beaucoup d'espèces africaines de primates non humains sont infectées par des lentivirus étroitement liés au VIH-1. Ces virus sont référencés comme des virus de l'immunodéficience simienne ou VIS (Figure 22). Le VISagm est une souche observée chez le singe vert africain tandis que le VISsm est observée chez le *sooty* mangabey. Ces singes sont adaptés à la présence de ces virus¹⁶⁶ qui sont détectés à des taux élevés dans le sang des hôtes mais qui n'induisent qu'une réponse immunitaire moyenne¹⁶⁷ et ne causent pas le développement d'un syndrome d'immunodéficience acquise¹⁶⁸. Aussi, ils ne présentent pas de niveaux élevés de mutations et de recombinaisons comme le VIH¹⁶⁹.

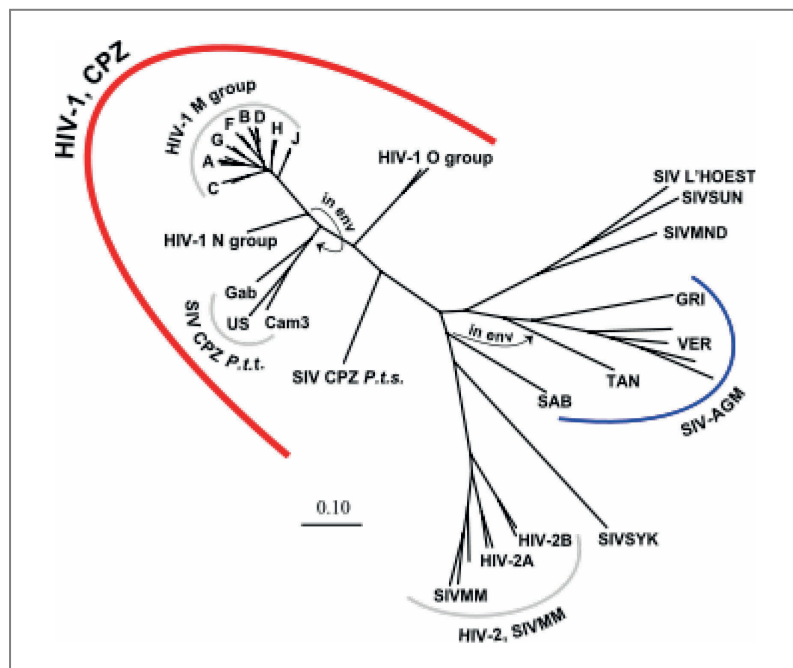


Figure 22: Relations phylogénétiques des lentivirus

(Los Alamos National Laboratory)

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/1999/1/intro.pdf>

Cependant, quand ils infectent des macaques rhésus ou cynomologues, leur variabilité est comparable à celle du VIH-1 infectant un humain¹⁷⁰. Aussi, les singes rhésus infectés par VISsm (aussi connu comme VISmac) développent le syndrome d'immunodéficience acquise et un spectre comparable d'infections opportunistes et de tumeurs observées chez l'humain infecté par le VIH-1¹⁷¹. Par ailleurs, le VIS du chimpanzé (VIScpz, Figure 22) est génétiquement le plus proche du VIH-1. Il est associé à une augmentation de la mortalité de son hôte naturel avec des symptômes comparables au SIDA¹⁷². Le VIScpz et le VIH-1 apparaissent comme avoir été récemment transmis du chimpanzé aux populations humaines, et celles-ci n'ont pas encore eu le temps de s'adapter au virus¹⁶⁶.

Des virus chimériques ont été synthétisés afin de pouvoir "mimer" une infection par le VIH-1 chez le singe. Ainsi, SHIV ("simian human immunodeficiency virus") est un virus construit sur la base génomique du virus simien associé à des

gènes codant pour diverses protéines du VIH-1 dont celles relatives à l'enveloppe. SHIV89.6P est dérivé du SHIV89.6, un virus chimérique construit à partir du virus simien VISmac239 et de gènes relatifs à un VIH-1 isolé d'un patient¹⁷³⁻¹⁷⁵. Les formes de ce virus SHIV89.6P causent aussi le SIDA chez les macaques¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Les caractéristiques de l'infection par le VIH-1, le VIS et la forme chimérique SHIV-89.6P sont présentées sur le Tableau III.

| Features of infection* | HIV-1 | SIV [†] | SHIV-89.6P |
|--|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Usual co-receptor | CCR5 | CCR5 | CXCR4 |
| Main target cell | Memory CD4 ⁺ T cells | Memory CD4 ⁺ T cells | Naive CD4 ⁺ T cells |
| Time to peak viral load | 2 weeks | 2 weeks | 2 weeks |
| Setpoint viral load (RNA copies per 1 ml of blood) | 10 ⁵ | 10 ⁷ | 10 ⁶ |
| Median survival time (without treatment) | 11 years | 3 years | 200 days |
| Time from infection to autologous neutralizing antibody response | 3 months to 1 year | 3–6 months | 6–12 weeks (in those that seroconvert) |

*HIV-1 infection of humans; SIV and SHIV-89.6P infection of Indian-origin rhesus monkeys. [†]SIV mac239/25. CCR5, CC-chemokine receptor 5; CXCR4, CXC-chemokine receptor 4; SHIV, simian human immunodeficiency virus.

Tableau III : Caractéristiques des infections du HIV-1, du SIV et du virus chimérique SHIV-89.6P³¹ (Letvin 2006).

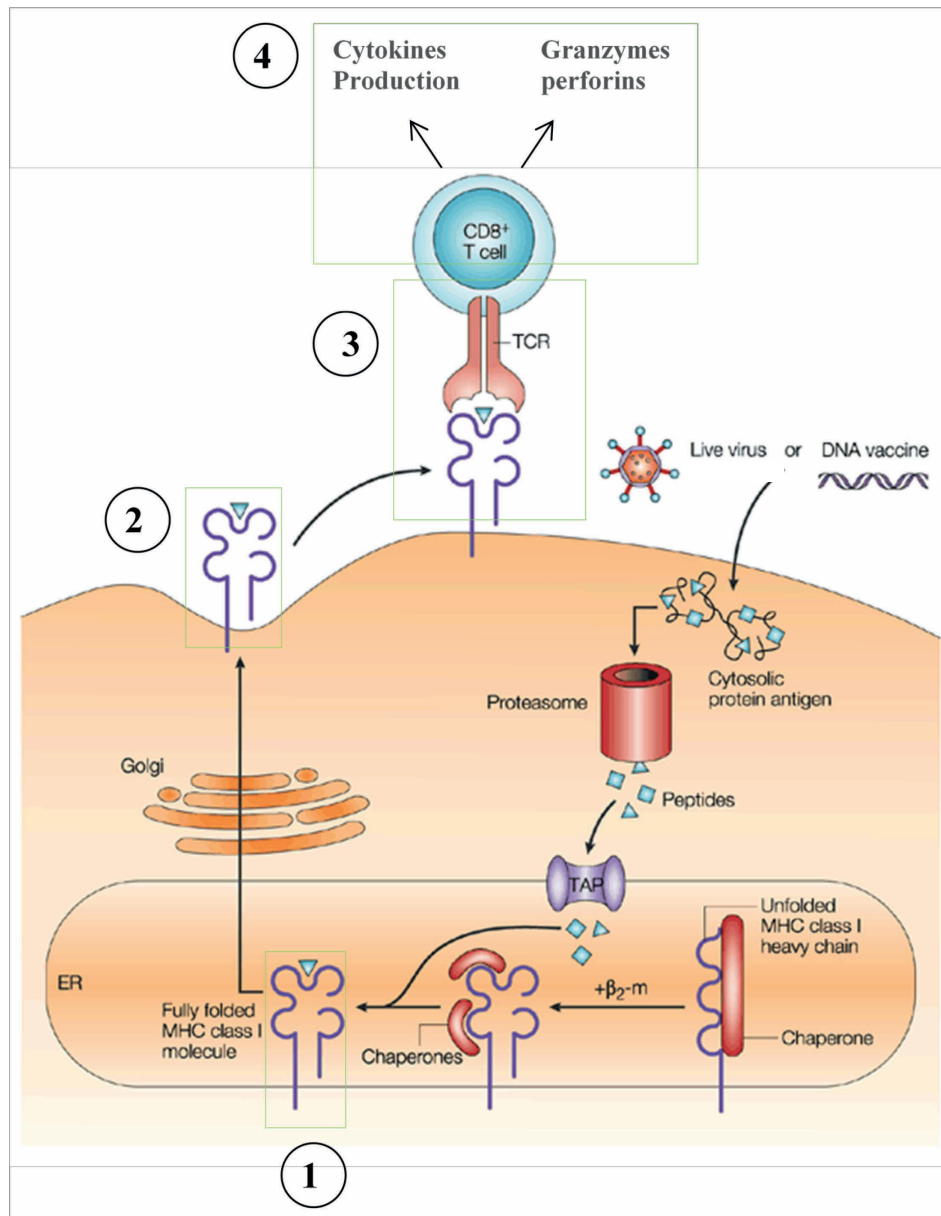
Bien que ces différents virus de l'immunodéficience chez les primates présentent des profils pathogéniques divers chez les singes asiatiques, les macaques infectés par le VIS ou par SHIV sont reconnus comme étant des modèles très importants dans l'exploration des mécanismes de l'immunopathogenèse liée au SIDA et dans les différentes approches de vaccinations contre VIH-1^{177,178}. Ils ont été particulièrement utiles dans la caractérisation des événements immunologiques et virologiques qui apparaissent durant la phase initiale de l'infection, période durant laquelle le VIH-1 est rarement détecté chez le patient par les cliniciens. Par ailleurs, ces modèles se sont avérés inestimables dans l'évaluation de diverses stratégies d'immunisations contre VIH-1³¹.

II. Réponse immunitaire des lymphocytes T CD8+

La Figure 23, présente en parallèle le processing d'une séquence relative à une protéine virale dans la cellule cible, exprimée après infection ou par l'intermédiaire d'un vecteur dans le cadre d'une immunisation (Figure 23A) et les méthodes utilisables à chaque étape, pour isoler et caractériser les lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître l'épitope relatif à la dégradation de cette protéine et d'induire une réponse (Figure 23 B). Ces stratégies expérimentales seront développées dans la section "Matériel et Méthodes".

Quand une protéine virale est exprimée dans le cytosol d'une cellule, elle est potentiellement dégradée par le protéasome en petits peptides (Figure 23A).

1. Ces oligopeptides ou épitopes (essentiellement des nonamères) se lient à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe-I dans le réticulum endoplasmique.
2. Le complexe [CMH-I/épitope/ β 2microglobuline (β 2m)] est ensuite présenté à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène.
3. La reconnaissance de ce complexe par un lymphocyte T CD8+ implique différentes parties du TCR notamment les chaînes variables α et β ($V\alpha$ et $V\beta$) et la région complémentaire déterminante 3 (CDR3) qui interagit directement avec l'épitope.
4. Cette reconnaissance aboutit en général à l'activation du lymphocyte qui produit alors des chimiokines, cytokines, perforines, granzymes, et peut conduire à la mort de la cellule infectée.



A

B

1. Assemblage d'un épitope issu de la dégradation de l'antigène avec une molécule du CMH-I
2. Présentation de l'épitope par la molécule du CMH-I
3. Reconnaissance du complexe épitope/MHC-I/β2m
4. Activation du lymphocyte T CD8+

1. "Peptide binding Assays" ou Test de liaison
2. Fabrication de tétramères spécifiques de variant de l'épitope étudié => cytométrie en flux
3. Caractérisation de chaque population de lymphocytes T CD8+ tétramère+ selon: son Vβ répertoire et des séquences CDR3 du TCRβ
4. Activation du lymphocytes T CD8+: Test IFN-γ ELISpot et marquage intracellulaire des cytokines(ICS)

Figure 23 : A. "Processing" de l'antigène à la suite d'une infection par le VIH-1 ou après immunisation. B. Méthode d'étude de la réponse des lymphocytes T CD8+ associée à la reconnaissance du complexe [CMH-I/épitope/β2m] par leur TCR. (Figure modifiée de McMichael et Hanke¹⁷⁹).

II.1. Identification de lymphocytes T CD8+ par leur TCR

Les récepteurs du lymphocyte T jouent un rôle primordial dans la reconnaissance de l'antigène et l'activation de la réponse immunitaire. L'ensemble des récepteurs exprimés par les cellules T constitue un répertoire et l'ensemble de ces répertoires détermine le statut immunologique d'un organisme.

Quatre-vingt quinze pour cent des lymphocytes T présentent des récepteurs de type $\alpha\beta$ composés de deux chaînes glycoprotéiques transmembranaires α et β . Chacune de ces chaînes comporte une région variable et une région constante. La juxtaposition des deux domaines variables constitue le site de reconnaissance de l'antigène (Figure 24).

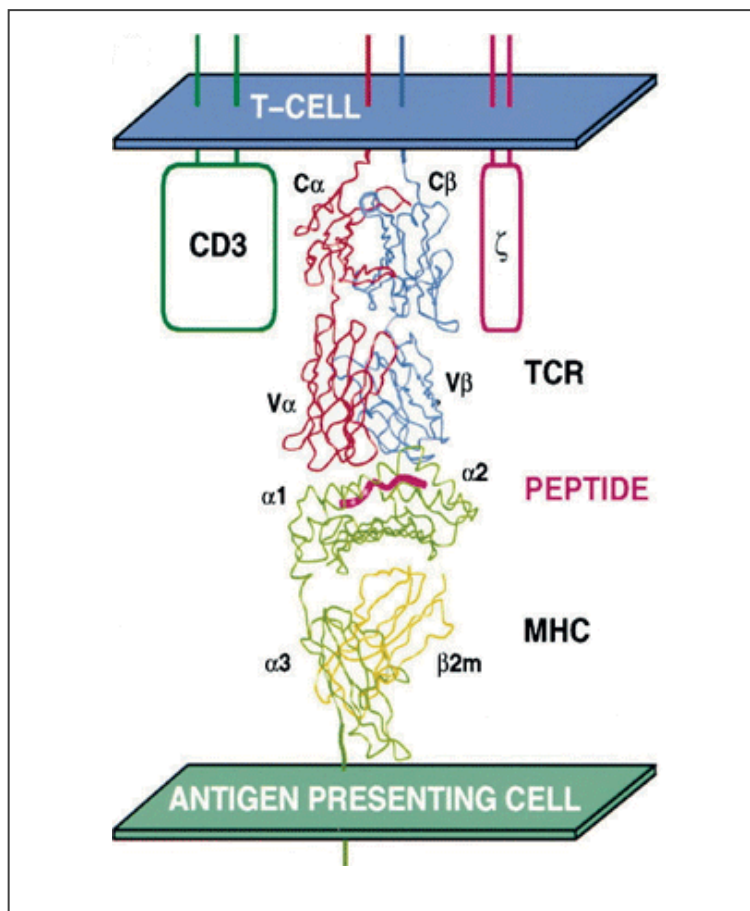


Figure 24 : Reconnaissance d'un peptide présenté par le CMH-I de la cellule présentatrice de l'antigène, par le TCR du lymphocyte T CD8+ : implication des chaînes variables α et β (d'après Hennecke 2001)¹⁸⁰.

Parce que chaque clone de lymphocytes T CD8⁺ exprime un unique récepteur, définir le répertoire de TCRs employé par une population de lymphocytes T CD8⁺ spécifique d'un épitope est une approche utile pour déterminer la clonalité de ces cellules¹⁸¹⁻¹⁸³.

Ainsi, la diversité clonale de lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître un épitope ou des variants peptidiques de celui-ci peut être évaluée en caractérisant le TCR de ces lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de chaque variant par:

- son V β répertoire
- et le séquençage des CDR3 du TCR β qui permet de clonotyper la population de lymphocytes T CD8⁺ étudiée.

II.1.1. V β répertoire d'une population de lymphocytes T CD8⁺

Une population de lymphocytes T CD8⁺ peut être caractérisée par son profil d'expression de différentes familles de gènes codant pour la chaîne variable β du récepteur des lymphocytes T CD8⁺ (V β répertoire).

Basé sur des données générées à partir d'un large séquençage d'ADNc relatifs à la chaîne β du TCR de lymphocytes T CD8⁺ de singes¹⁸⁴, des familles et sous-familles de gènes ont été identifiées¹⁸⁴⁻¹⁸⁸. L'expression de ces gènes (Vb) est utilisée pour déterminer le V β répertoire de chaque population de lymphocytes T CD8⁺ spécifique d'un épitope, isolée chez des singes rhésus immunisés contre le VIH-1 et/ou infectés par SHIV^{173,183,189}.

L'usage des V β été investigué dans le contexte d'infections et aussi d'immunisations. Certaines études ont démontré que l'expansion de sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ exprimant différentes familles de gènes Vb représente un composant majeur dans la réponse immunitaire primaire contre des infections du VIH¹⁹⁰ ou du VIS¹⁸⁴. Il s'agit essentiellement de lymphocytes T CD8⁺ qui expriment un gène Vb et donc qui présente un V β répertoire restreint. Cependant ces réponses de type "oligoclonal" ont été mises en cause dans le phénomène d'échappement de virus à la réponse immunitaire^{93,191}. A l'inverse, une immunisation thérapeutique de patients infectés par le VIH-1 sous HAART a généré des populations de lymphocytes T CD8⁺ polyclonales fonctionnelles¹⁹².

L'analyse du TCR β de lymphocytes capables de reconnaître un ou plusieurs variants d'un épitope peut donc donner des indications sur la capacité de ces populations à reconnaître des épitopes de diverses souches du VIH-1¹⁴³. Si une population de lymphocytes peut reconnaître de multiples variants d'un épitope du VIH-1, la probabilité qu'une mutation dans la séquence relative à cet épitope conduise à la non reconnaissance du virus mutant par les cellules T effectrices serait limitée¹⁴⁴. De plus, si plusieurs populations de lymphocytes peuvent reconnaître la même séquence peptidique d'un épitope du virus en utilisant des TCR β différents, le risque que cet épitope ne soit pas reconnu est aussi minimisé^{183,193}. Plusieurs études ont montré que la diversité du répertoire relatif au TCR des lymphocytes T était associée à des réponses immunitaires efficaces contre des pathogènes variés^{157,194} et pouvait être impliquée dans le contrôle de l'échappement de virus¹⁹⁵.

II.1.2. Séquençage des CDR3 du TCR β de lymphocytes T CD8+

Un autre moyen d'évaluer la clonalité des lymphocytes T capables de reconnaître différentes souches du VIH-1 est de séquencer la région déterminante complémentaire 3 (CDR3) du TCR β , qui est directement au contact de l'épitope.

La variabilité des séquences relatives aux régions variables n'est pas répartie de façon homogène mais au contraire se concentre dans trois zones de plus grande variabilité, dites hypervariables au nombre de trois par chaîne α et β . Entre les zones hypervariables, les séquences présentent une moindre variabilité et forment des feuillets β . Les zones hypervariables forment des boucles tournées vers l'extérieur des feuillets β et leur association constitue le site directement en contact avec l'antigène. L'association des six régions hypervariables forme de véritables régions complémentaires à l'antigène qui constituent la spécificité de reconnaissance de cet antigène ; elles sont appelées régions déterminant la complémentarité (CDR, Complementary Determining Regions). La variabilité des CDR1 et CDR2 est moindre et d'origine germinale tandis que celle du CDR3 est plus importante et générée au niveau somatique lors de la maturation du lymphocyte.

En fait, le système immunitaire a développé des mécanismes pour produire des répertoires de lymphocytes T (et de lymphocytes B) extrêmement diversifiés, et la production des différents récepteurs est en effet intimement liée au processus de maturation des lymphocytes. Celle-ci s'établit à partir des cellules souches de la moelle osseuse et se décompose en trois étapes : prolifération des cellules immatures, expression des gènes qui codent pour les récepteurs d'antigènes et sélection des lymphocytes qui expriment des récepteurs d'antigènes fonctionnels. Ces récepteurs sont codés par plusieurs segments géniques variables (V), de diversité (D) et de

jonction (J). Séparés les uns des autres dans la lignée germinale, ils se recombinent au cours de la maturation lymphocytaire. La diversité du répertoire des lymphocytes T s'explique donc par la diversité des gènes qui codent pour les différentes régions (domaines V, D, J) du TCR et par leur réarrangement qui conduit à la formation du récepteur spécifique du lymphocyte T (Figure 25).

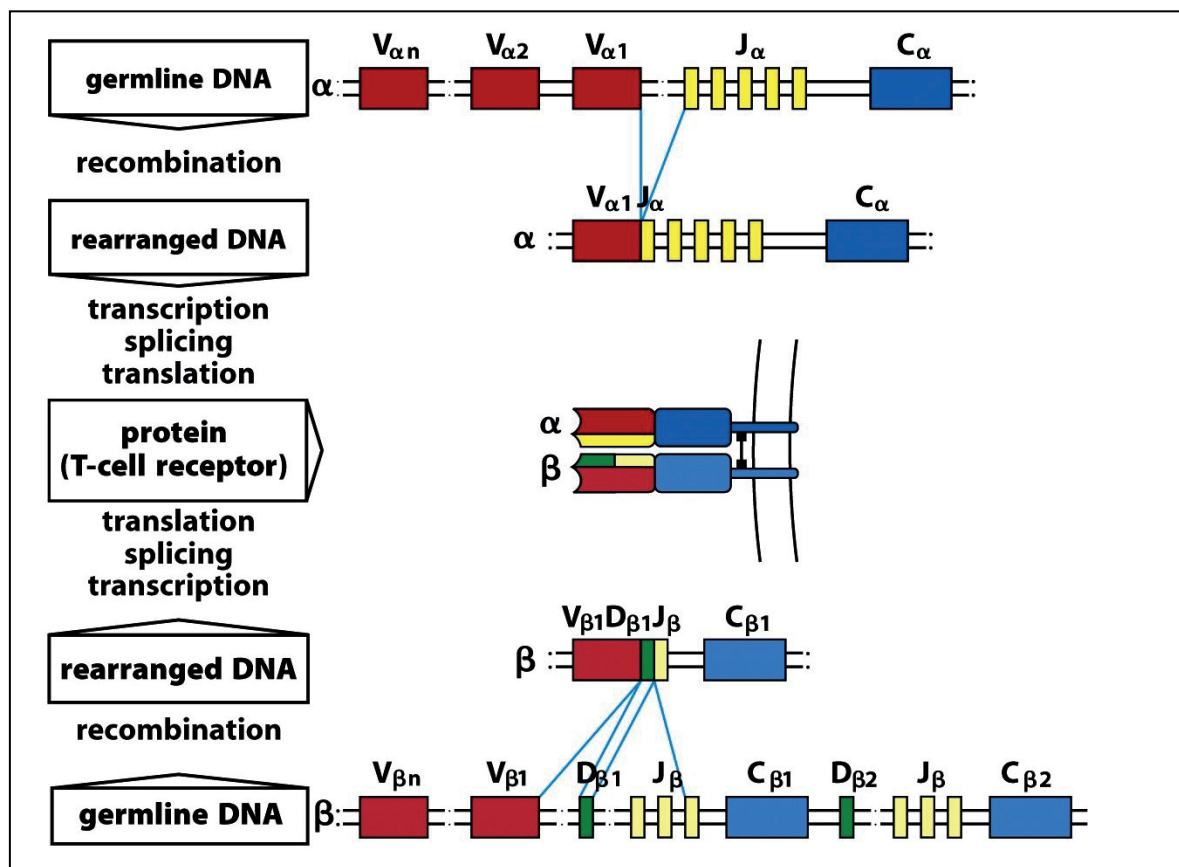


Figure 25 : Expression et réarrangement des gènes codant pour les chaîne α et β du récepteur du lymphocyte T¹⁹⁶.

A cette diversité combinatoire s'ajoute la diversité jonctionnelle qui implique des variations de séquences nucléotides au niveau de la jonction des séquences codantes des gènes réarrangés relatives aux domaines V, D et J du TCR β , et celles relatives aux domaines V et J du TCR α . Si la diversité combinatoire est limitée par le nombre de segments géniques V, D, J possibles, la diversité jonctionnelle est pratiquement illimitée dans le sens où elle est produite par trois types de changements de séquences qui fournissent chacun plus de séquences que celles qui étaient présentes dans les gènes de la lignée germinale : (i) Dans un premier temps, les exonucléases peuvent retirer des nucléotides aux segments géniques V, D, J au moment de la recombinaison. (ii) A l'inverse, la terminal-désoxyribonucléodidyl transférase (TdT) utilise des nucléotides qui ne font pas partie des gènes de la lignée germinale et les ajoute de manière aléatoire aux sites de recombinaison V(D)J, formant ainsi les régions N. (iii) Par ailleurs, au cours d'une étape intermédiaire de ce processus de recombinaison V(D)J, avant que les cassures de l'ADN ne soient réparées, des séquences d'ADN en surplomb peuvent être créées puis remplies par des nucléotides, introduisant davantage de variabilité dans les sites de recombinaison. La diversité jonctionnelle a donc pour conséquence que la séquence nucléotidique du site de recombinaison V(D)J de chaque TCR produite par un clone lymphocytaire diffère d'un clone à l'autre. Cette jonction code pour les acides aminés du CDR3, la plus variable des régions CDR, l'une des plus importantes dans la reconnaissance des antigènes. En effet, les séquences d'acides aminés du CDR3 sont complémentaires de la séquence peptidique de l'épitope reconnu (Figure 26).

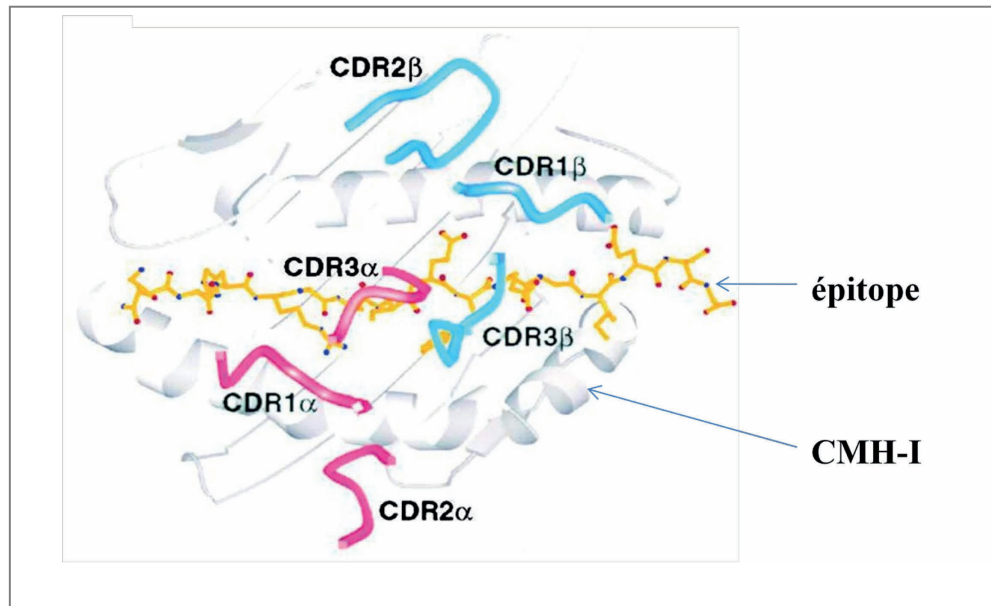


Figure 26 : Placement des régions complémentaires déterminantes autour du peptide (épitope) présenté par CMH-I (Figure modifiée de Hennecke et al., 2001)¹⁸⁰ : En bleu, les CDR relatives au TCRβ; en rose, les CDR relatives au TCRα.

II.1.3. Capacité des lymphocytes T CD8+ à reconnaître différents

variants d'un même épitope : plasticité du TCR

Des études de cristallographie aux rayons X de TCR liés à des complexes peptide-CMH ont montré que chaque TCR ne reconnaît qu'un à trois résidus du peptide associé au CMH¹⁹⁷. Le fait que le CDR3 ne reconnaisse et n'interagisse qu'avec une partie des résidus de l'épitope reconnu confère au répertoire de lymphocytes une plasticité qui lui permet de reconnaître un large spectre de diverses antigènes. Cette capacité à reconnaître différents peptides qui présentent une similarité limitée de séquence est décrite comme la cross-réactivité ou réactivité croisée du TCR. Si un même TCR peut interagir avec divers épitopes, un même antigène peut aussi être reconnu par divers TCR.

Identifier les lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître une large variété de souches du VIH-1 et définir comment ces lymphocytes CD8⁺ T reconnaissent des variants d'un même épitope relatifs à des formes divergentes du VIH-1 sont des étapes clef. En effet, elles apportent des informations sur l'immunopathogenèse liée à l'infection de ces cellules par le VIH-1 et sur les stratégies à utiliser pour développer un vaccin efficace contre les diverses formes du virus. La diversité clonale et le potentiel cross-réactif des lymphocytes T CD8⁺ élicités après infection ou générés par la vaccination pourrait contribuer à limiter l'émergence de formes mutantes du virus potentiellement capables de se soustraire à la reconnaissance immunitaire^{179,198-201}. En effet, plusieurs types de vaccins utilisant des immunogènes relatifs au seul clade B du VIH-1 (vaccin "simple clade") ou à plusieurs clades du virus (vaccin "multiclade") peuvent générer des lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître des formes génétiquement divergentes du VIH-1^{148,202}. Par ailleurs, dans un groupe de prostituées de Nairobi séronégatives exposées fréquemment à différentes souches du VIH-1 (clade A, C, et D) pendant 12 ans (considérées comme des HEPS), des lymphocytes T CD8⁺ préalablement décrits comme spécifiques à des épitopes du clade B du VIH-1 ont été identifiés. La séquence de ces épitopes du clade B du VIH-1 se trouvent être largement conservée dans les mêmes épitopes relatifs aux clades A et C du virus²⁰³.

Dans notre étude, chaque séquence CDR3 du TCR β d'un lymphocyte T CD8⁺ définit un clonotype. Récemment, Price et al. ont appelé une séquence CDR3 du TCR β d'un clone de lymphocytes T CD8⁺ observée chez plus de deux individus, un "clonotype public"; à l'inverse, une séquence CDR3 du TCR d'un clone de lymphocytes T CD8⁺ observée chez un seul individu est appelé "clonotype privé".

D'après une étude réalisée chez les rhésus macaques Mamu-A01+, il semblerait que l'usage de clonotypes publics soit associé à la reconnaissance de variants d'un même épitope et aussi à une meilleure protection contre le VIS²⁰⁴.

II.2. Fonctions des lymphocytes T CD8+²⁰⁵

La reconnaissance du complexe [CMH classe I/épitope/β2m] par le TCR conduit en général à l'activation de celui-ci. Un certain nombre de cytokines comme l'interféron gamma (IFN-γ), le Tumor Necrosis Factor (TNF-α) et l'interleukine 2 (IL-2) peuvent être produites. L'IFN-γ et TNF-α ont des activités antivirales. L'IFN-γ stimule notamment la synthèse du CMH-I et donc favorise la présentation des peptides viraux à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes et leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. TNF-α stimule les macrophages et la phagocytose. L'IL-2 induit la prolifération des lymphocytes, active les lymphocytes T et favorise la sécrétion d'autres cytokines. Elle stimule par ailleurs l'activité des cellules NK, la maturation des lymphocytes B et la synthèse d'anticorps.

Les tests ELISPOT (Enzyme Linked Immunoabsorbent Spot assay) détectant l'IFN-γ ont été largement utilisés comme moyen de quantifier la réponse immunitaire des lymphocytes T²⁰⁶⁻²⁰⁹ notamment dans les essais cliniques de vaccins candidats contre le VIH-1^{73,162,210-212}. D'autres tests permettent de détecter plusieurs cytokines^{213,214}. Ces tests sont aussi utilisés pour tester des vaccins contre le VIH-1 ou le VIS^{215,216}. La capacité des lymphocytes T CD8+ à générer une réponse fonctionnelle multiple telle que la sécrétion combinée de plusieurs cytokines, est appelée

polyfonctionnalité²¹⁷. Des études ont mis en évidence l'importance de populations de lymphocytes T CD8+ polyfonctionnelles contre le VIS et le VIH-1. Almeda et al. ont montré qu'un meilleur contrôle de la réplication du virus est lié notamment à la polyfonctionnalité des lymphocytes CD8+²¹⁶. D'autres études ont démontré l'importance de sous-populations de lymphocytes T polyfonctionnelles générées après immunisation dans le contrôle et la protection contre le VIS et le VIH-1^{163,218}. Chez des patients non progressseurs, la présence de lymphocytes T CD8+ qui maintiennent une capacité fonctionnelle importante a été observée²¹⁹.

Aussi, les lymphocytes T CD8+ peuvent synthétiser des chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β qui se fixent au co-récepteur CCR5 du VIH-1 à la surface des lymphocytes T CD4+, mais aussi la perforine et des granzymes concentrés dans des granules lytiques. La perforine est impliquée dans le transfert du contenu des granules dans le cytoplasme de la cellule infectée et les granzymes déclenchent l'apoptose après leur libération dans le cytoplasme de la cellule cible.

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Un vaccin idéal contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) éliciterait une réponse cellulaire et humorale contre les différentes souches du virus responsable de la pandémie du SIDA et permettrait également d'éviter l'échappement de formes mutantes émergentes.

De nombreuses études ont montré l'importance des lymphocytes T CD8+ dans le contrôle du VIH-1 et du VIS, mais peu ont caractérisé les populations de lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître des variants d'un même épitope provenant de différentes formes du virus.

Le but de ma thèse était d'évaluer la capacité de vaccins qui utilisent l'enveloppe comme immunogène (HxB2 Env, 89.6P Env ou clade C Env), à générer des lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître des variants d'un épitope de l'enveloppe du VIH-1, p41A.

L'ensemble de mon travail de thèse a porté sur l'étude de la diversité clonale des lymphocytes T CD8+ générés après immunisations de singes rhésus Mamu-A01+ et élicitées après infection par un virus chimérique, SHIV.

Les objectifs de ma thèse étaient les suivants :

- ✓ identifier les populations de lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître jusqu'à 9 variants de p41A,
- ✓ évaluer le potentiel cross-réactif de ces populations,
- ✓ caractériser les populations de lymphocytes T CD8+ spécifiques de chaque variant par l'analyse de leur V β répertoire et par le séquençage des CDR3 du TCR β ,

- ✓ vérifier si la reconnaissance de ces différents variants par une population de lymphocytes T CD8+ conduit à leur activation.

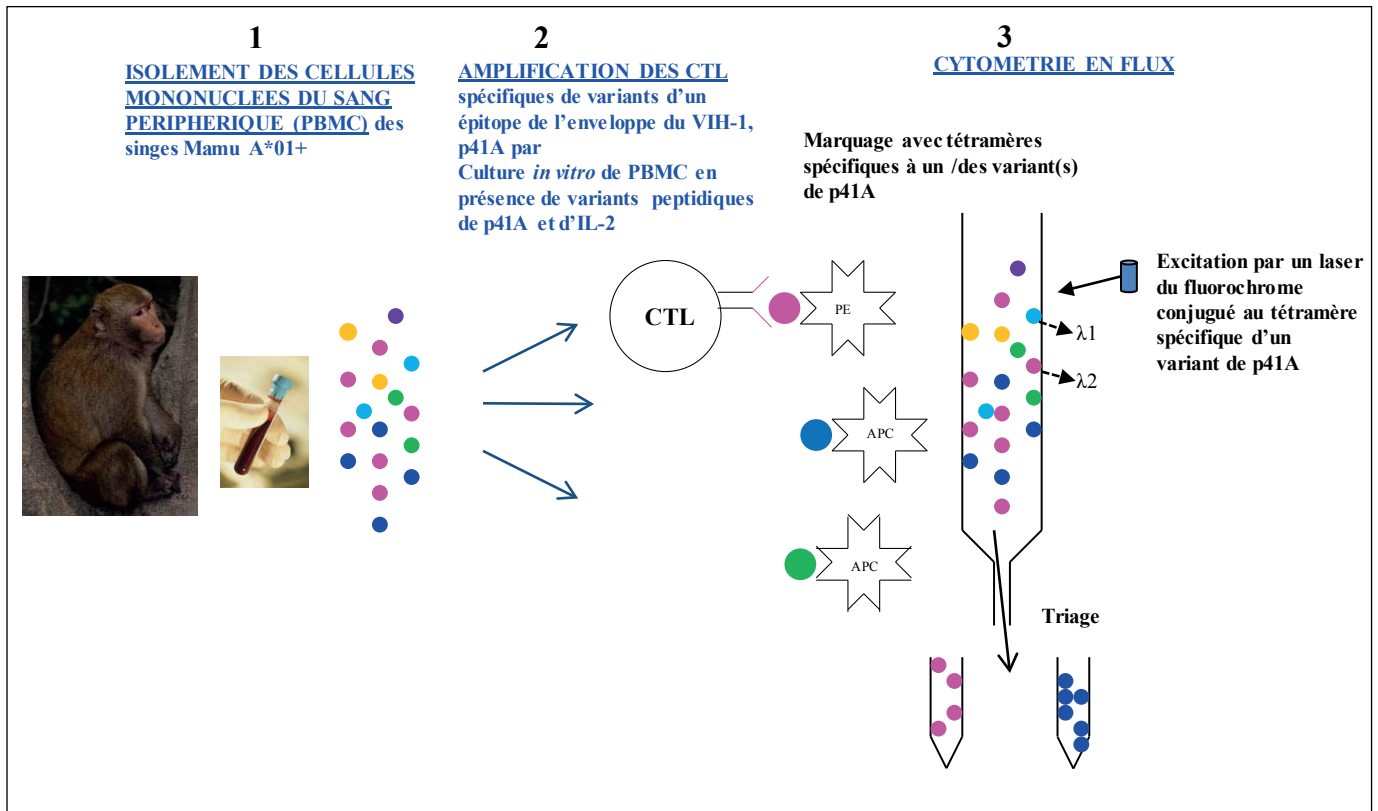
L'étape suivante était la comparaison des populations de lymphocytes T CD8+ spécifiques de variants de p41A observées après vaccination et après infection des singes vaccinés afin d'évaluer la maintenance ou la perte de ces populations clonales générées par la vaccination.

Finalement, la comparaison des populations élicitées dans le groupe de singes vaccinés et de celles observées dans le groupe de singes non vaccinés, et infectés par SHIV-KB9 avait pour but d'identifier des clonotypes qui pourraient conférer une protection qui ne serait pas naturellement induite.

La figure 27 présente la **stratégie expérimentale générale** mise en œuvre dans mon projet de thèse. L'ensemble de ces techniques sont développées dans la section "Matériel et Méthodes".

Figure 27: DIVERSITE CLONALE DES LYMPHOCYTES T CD8+ ELICITES PAR VACCINATIONS DE SINGES RHESUS MAMU-A*01+

STRATEGIE EXPERIMENTALE (partie1)

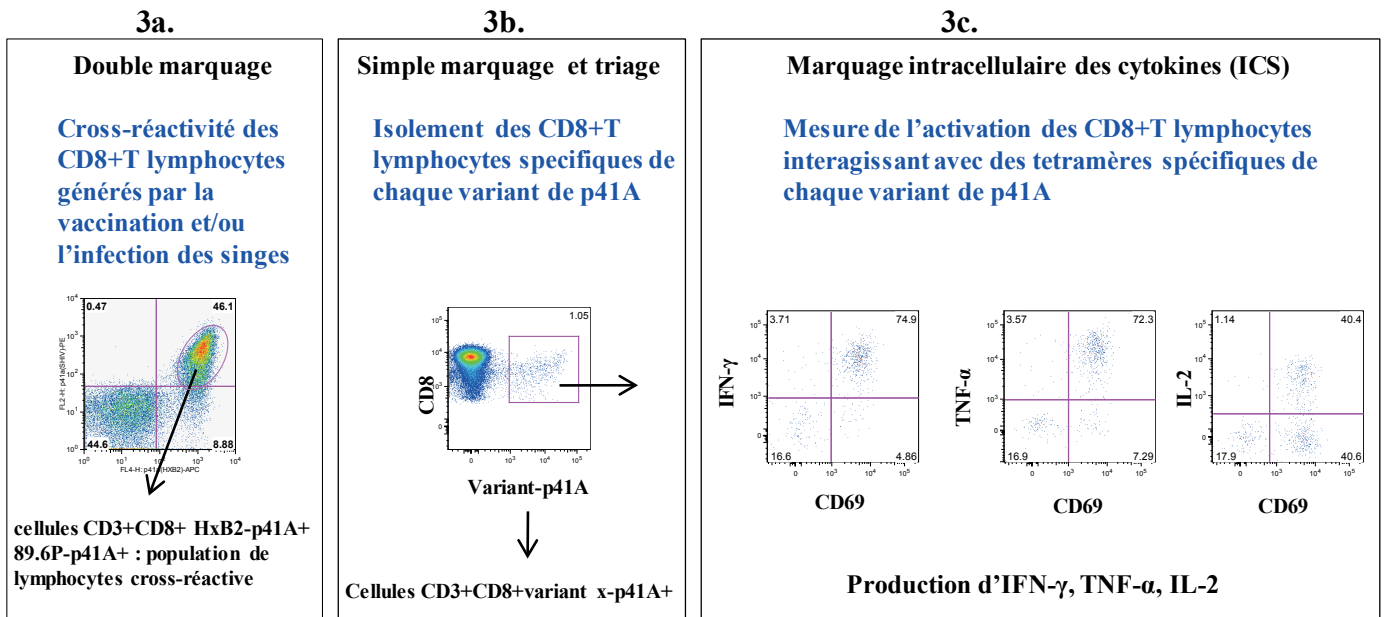


L'évaluation de la diversité des populations de lymphocytes T CD8+ générées après vaccinations qui utilisent l'enveloppe comme immunogène est basée sur la capacité de ces CTL à reconnaître des variants d'un épitope de l'enveloppe du virus, p41A. La réponse contre 9 variants de p41A a été testée. Leur séquence peptidique (nonamérique) diffère par un ou deux acides aminés.

Chaque population de lymphocytes a été définie et évaluée par :

- Sa capacité à se lier à des tétramères construits avec un variant de p41A (**% de lymphocytes T CD3+CD8+variant-p41A+ / cross-réactivité**)
- Son profil d'expression des différentes familles et sous-familles de gènes codant pour la chaîne variable β du récepteur au lymphocyte T (**V β répertoire**),
- La ou les séquences des régions complémentaires déterminantes 3 (CDR3) du TCR β** impliquées dans la reconnaissance de l'épitope,
- Sa capacité à **produire des cytokines** (suite à son activation due à la présence de l'épitope).

STRATEGIE EXPERIMENTALE (partie2)

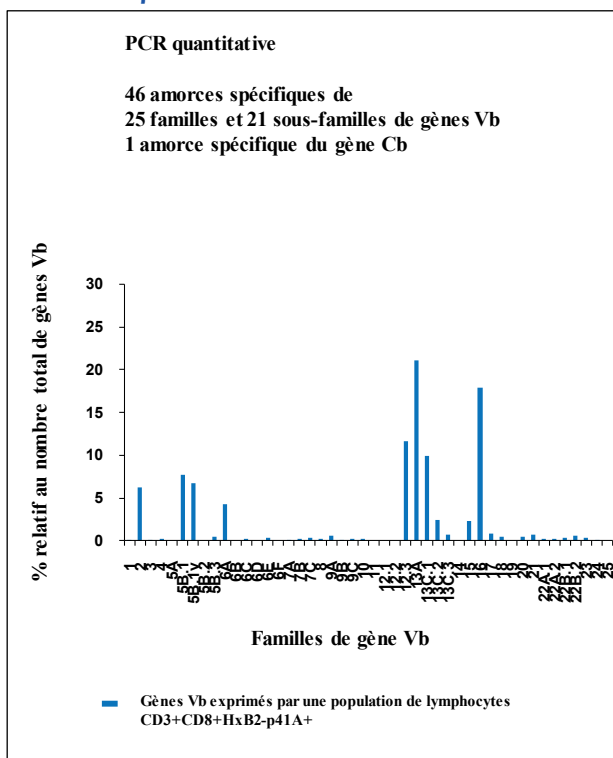


4 BIOLOGIE MOLECULAIRE

Isolation des ARN totaux

Banque d'ADNc

V β REPERTOIRE



SEQUENCAGE DE LA REGION CDR3 du TCR β

PCR classique, clonage et séquençage

amorce V β_x sens

amorce C β antisens

| Epitope-spécifique CTL populations | CDR3 séquences | | | J β gène | Fréquence |
|------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|----------------|-----------|
| | V β | D β | J β | | |
| 89.6P-p41A | CASS SGQTANPNT AQLFF | | | 2.2 | 102/103 |
| YAPPIAGOI | CASS SWTDY | SPLYF | | 1.6 | 1/103 |
| HxB2-p41A | CASS SGQTANPNT AQLFF | | | 2.2 | 107/107 |
| YAPPISSGOI | | | | | |
| Variant 1 | CASS SGQTANPNT AQLFF | | | 2.2 | 118/118 |
| YAPPIAGNI | | | | | |
| Variant 5 | CASS SGQTANPNT AQLFF | | | 2.2 | 98/102 |
| CARS SGQTANPNT AQLFF | | | | | 1/102 |
| YAPPISSGRI | CASS SGQTANPNA AQLFF | | | 2/102 | 2/102 |
| | CASS SGRITANPNT AQLFF | | | 1/102 | 1/102 |
| Variant 8 | CASS SGQTANPNT AQLFF | | | 2.2 | 105/105 |
| YAPPIAGOI | | | | | |

■ CDR3 séquence capable d'interagir avec 5 variants de p41A définissant un clonotype cross-réactif

MATERIEL ET METHODES

Cette section "Matériel et Méthodes" présente l'ensemble des groupes de singes et des stratégies expérimentales impliqués dans la réalisation de mon projet de thèse. Les détails sont disponibles dans la section "Matériel et Méthodes" de chaque article associé à ce projet et présenté dans la section "Résultats".

I. Immunisations et infections des singes rhésus

Douze singes rhésus adultes d'origine indienne (*Macaca mulatta*) ont été maintenus dans un établissement accrédité par l'*Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care* en accord avec les guides de soins et du comité d'utilisation d'animaux en institution pour *Harvard Medical School*, et du guide de soins et d'utilisation d'animaux de laboratoire²²⁰.

I.1. Phénotypage des singes

Le phénotypage des singes a été réalisé par PCR avec des amorces spécifiques aux allèles du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I comme il a été décrit précédemment^{83,221}. Tous exprimaient l'allèle Mamu-A*01.

I.2. Immunisations (Tableau IV)

Huit singes ont été immunisés en utilisant un ADN plasmidique (en primo-immunisation) et un adénovirus recombinant (rappel) comme vecteur exprimant les séquences relatives aux gènes gag, pol et nef du VISmac239 et à une forme de l'enveloppe du VIH-1. Comme il a été décrit précédemment, deux singes (419 et

VFA) ont été vaccinés avec le clade B de l'enveloppe du VIH-1 (HxB2 Env) et deux autres singes (414 et KPA) ont été vaccinés avec le clade C de l'enveloppe (clade C Env)¹⁴⁸. Un troisième groupe de quatre singes (AW2P, AW28 et AV83, AW13) a été vacciné avec la forme chimérique SHIV89.6P de l'enveloppe. AV83 et AW13 ont été immunisés exclusivement par l'intermédiaire d'un adénovirus recombinant comme précédemment décrit¹³².

I.3. Infections des singes (Tableau IV)

La moitié des singes immunisés a été infectée par voie intraveineuse avec 1×10^8 copies d'ARN du virus simien-humain de l'immunodéficience SHIV-89.6P (n=4), comme décrit précédemment¹⁴⁸. L'autre moitié des singes immunisés ainsi qu'un groupe de quatre singes non vaccinés (8998, 3096, 522.98 et 256.06) ont été infectés dans les mêmes conditions avec le clone KB9 de SHIV-89.6P (n=8). Ce virus a été précédemment décrit par Manuel et al.¹⁸³. Brièvement, il présente une mutation dans un épitope de Gag, p11C compensée pour permettre la génération d'un virus répliquatif²²².

| | | | | | |
|--|---|-----------------------|------------------------|------------------------|---|
| Primo- Immunisations Semaines 0,4 et 8 (ADN) ou semaines 0 et 8 (Ad5) | ADN plasmidique (pVR1012) :VIS mac239 Gag Pol Nef | | | Ad5: Gag Pol | Pas de vaccination 8998 3096 156.06 522.98 |
| | HIV-1 clade C Env | HIV-1 HxB2 Env | HIV-1 89.6P Env | HIV-1 89.6P Env | |
| | 414 KPA | 419 VFA | AW28 AW2P | AW13 AV83 | |
| Rappel Semaine 26 | Ad5 Gag Pol HIV-1 89.6P Env | | | | |
| Infection Semaine 42 | SHIV-89.6P | | SHIV-KB9 | | |

Tableau IV: Immunisations et infections des singes rhésus Mamu-A*01+. Quatre types de vaccination ont été testés pour leur capacité à générer des lymphocytes capables de reconnaître divers isolats du VIH-1. Un groupe contrôle de singes non immunisés a été également étudié. Le nom des singes est indiqué en gris.

Afin de caractériser les lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître des variants d'un épitope relatif à l'enveloppe de formes divergentes du groupe M du VIH-1, plusieurs méthodes ont été combinées :

1. La première étape est de vérifier la capacité de ces variants peptidiques à se lier au CMH-I par des expériences de compétition entre ces variants non radiomarqués et un peptide de référence marqué à l'iode radioactif et lié au CMH-I. Des études ont montré que l'immunogénicité d'un épitope est liée à sa capacité de liaison à une molécule du CMH-I^{223,224}; ceci peut donc avoir des implications dans la mise au point de vaccins contre le VIH-1²²⁵.

2. La deuxième étape est de fabriquer des tétramères spécifiques à chacun de ces variants pour marquer les populations de lymphocytes T CD8+ se liant à ces tétramères.

3. La 3ème étape est de caractériser les populations les lymphocytes T CD8+ spécifiques de chaque variant testé :

- en fonction des différents gènes codant pour la chaîne variable β exprimés par ces cellules, constitutifs de leur V β répertoire

- et en fonction de la diversité des séquences relatives au CDR3 de leur TCR β .

4. La dernière étape consiste à mesurer la production de cytokines par chaque population de lymphocytes spécifiques d'un variant testé.

II. Evaluation de la capacité de liaison de variants peptidiques de p41A au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, Mamu-A*01

L'accrochage d'un épitope à Mamu-A*01 est important dans le processus de présentation de l'épitope à la surface de la cellule infectée et dans la reconnaissance du complexe [Mamu-A*01/épitope/ β 2m] par le récepteur des lymphocytes T qui seront ainsi activés et pourront notamment induire la mort de la cellule infectée.

L'évaluation de la capacité de liaison des variants peptidiques de p41A à Mamu-A*01 a été réalisée en 3 étapes (Figure 28)

- 1) Production de Mamu-A*01 par une lignée de lymphoblastes 721.221;
- 2) Purification de Mamu-A*01 par chromatographie d'affinité;
- 3) "Peptide Binding Assays" ou test de liaison : Expérience de compétition entre HxB2-p41A (épitope relatif au clade B de l'enveloppe du VIH-1) radiomarqué, lié à Mamu-A*01, et de 22 variants de cet épitope, non marqués (couvrant les 11 clades du VIH-1), listés dans la Figure 1A de l'article 2 (Cf. Résultats).

Etape 1 : Production de Mamu-A01

Nous avons utilisé une lignée de lymphoblastes B humains 721.221 n'exprimant pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à leur surface. Cette lignée cellulaire a été transfectée par un vecteur qui porte la séquence de Mamu-A*01 comme il a été précédemment décrit^{226,227}. La culture de

cette lignée transfectée pour produire Mamu-A*01 a été réalisée à grande échelle et rythmée par des récoltes périodiques.

Etape 2 : Purification de Mamu-A*01 par chromatographie sur colonne

Mamu-A*01 a été purifiée par plusieurs passages du lysat d'environ dix milliards de cellules de la lignée 721.221 transfectées préalablement de façon stable, à travers une série de colonnes de sépharose et de protéine A. Au final, le lysat est passé à travers une colonne d'immunoaffinité constituée d'anticorps anti-CMH classe I (mAb W6/32). Après élution de la protéine Mamu-A*01, la pureté de l'échantillon et le rendement ont été mesurés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturante (SDS-PAGE).

Etape 3 : "Peptide Binding Assays"

Ces expériences consistent à mesurer l'inhibition de la liaison du peptide HxB2p41A iodiné (peptide index) à Mamu-A*01 en l'incubant ce complexe avec des concentrations croissantes de chaque peptide à tester, non marqué. La radioactivité des échantillons relative au montant restant de peptide index lié à Mamu-A*01 après incubation avec un peptide froid est mesurée avec un compteur à scintillation. Le pourcentage d'inhibition de l'accrochage du peptide index à Mamu-A*01 par les peptides testés est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$[1 - (\text{c.p.m avec le peptide compétiteur} - \text{c.p.m du contrôle négatif}) / (\text{cpm du contrôle positif} - \text{c.p.m du contrôle négatif})] \times 100.$$

La concentration du peptide testé nécessaire pour inhiber 50% de la liaison du peptide index à Mamu-A*01 définit l'IC₅₀ (Inhibitory concentration 50) du peptide testé. Seuls les peptides ayant un IC₅₀ comparable, et proche de celui du peptide index, ont été sélectionnés pour construire des tétramères spécifiques à ses variants.

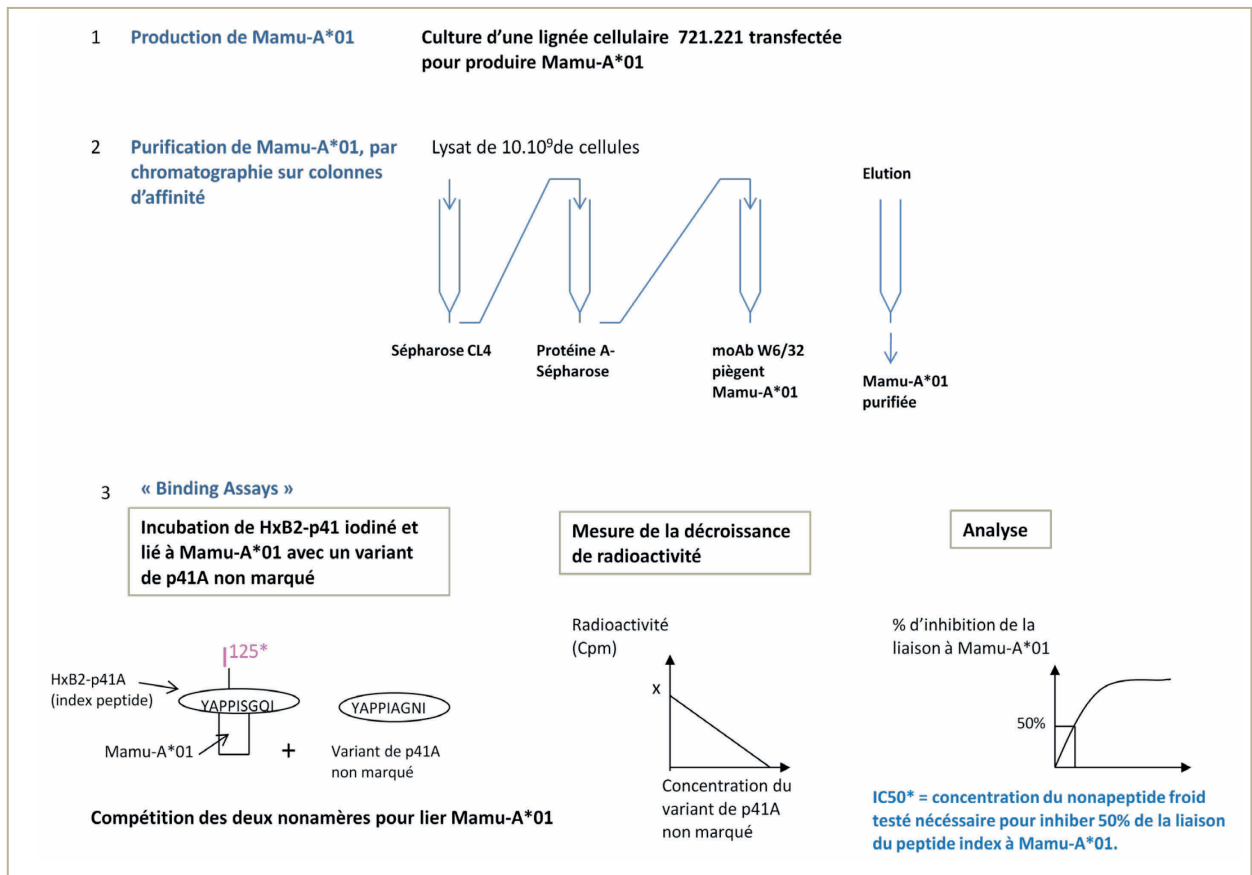


Figure 28 : Mesure de l'affinité de variants peptidiques de p41A pour Mamu-A*01. De la synthèse de Mamu-A01 à la détermination des IC₅₀ des variants peptidiques testés.

III. Evaluation de la capacité de différents types d'immunisations à générer des lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître différents isolats du VIH-1

L'utilisation de complexes tétramériques [CMH classe I/épitope peptide/ β 2m] pour identifier des lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un épitope a permis un développement majeur dans la compréhension de leur rôle dans le contrôle des infections virales²²⁸. En effet, ces différents complexes biotinylés, tétramérisés, et couplés à un fluorochrome permettent de visualiser par cytométrie de flux les lymphocytes T CD8+ capables de se lier aux tétramères construits avec cet épitope. Ils permettent par ailleurs de mesurer la capacité des lymphocytes T CD8+ spécifiques de cet épitope à reconnaître des variants peptidiques de celui-ci.

p41A (YAPPISGQI) est un épitope de l'enveloppe du clade B du VIH-1 décrit par Egan et al. Dans cette étude réalisée chez des singes rhésus infectés par SHIV, les lymphocytes T CD8+ spécifiques de cet épitope ont été quantifiés *in vitro*, grâce à leur capacité à se lier aux tétramères construits avec ce peptide¹⁴².

L'identification de lymphocytes capables de reconnaître différents isolats du VIH-1 a été réalisée grâce à l'utilisation de tétramères construits pour 9 variants de p41A ayant une affinité comparable pour Mamu-A*01 et couvrant la majorité des différents clades du groupe M du VIH-1 (Figure 1C de l'article 2, Résultats).

Un simple marquage fournit des informations sur la capacité de CTL à reconnaître chaque variant de p41A testé (reconnaissance) et de trier les cellules spécifiques de chaque variant afin d'étudier leur diversité clonale. Un double marquage permet

d'évaluer la capacité de CTL à reconnaître plusieurs variants de p41A (cross-réactivité ou réactivité croisée).

III.1. Fabrication des tétramères (Figure 30A)

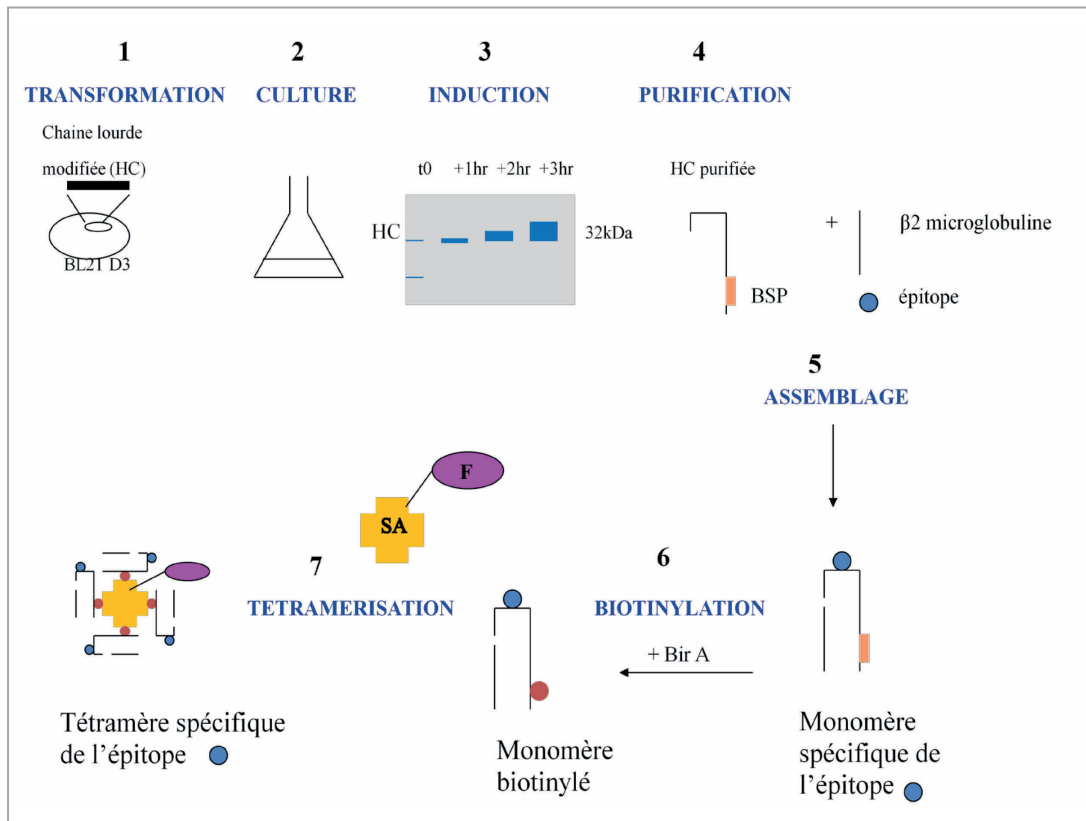
Chaque monomère constitutif d'un tétramère est le résultat de l'association:

- d'une chaîne lourde α (HC) produite par une souche cellulaire transformée (BL21) et purifiée par différentes étapes de centrifugation et de sonication; elle porte un site de biotinylation.
- de la microglobuline (β 2m) produite dans des bactéries transformées (JM109) et purifiée
- et d'un épitope (nonamère), variant de p41A.

Chaque monomère a été purifié par HPLC puis biotinylé par l'action d'une enzyme, la Bir A.

La dernière étape est la tétramérisation qui consiste à associer de la streptavidine couplée à un fluorochrome [phycoérythrine (PE) ou allophycocyanine (APC)] et le monomère biotinylé. Chaque tétramère a été préparé à partir de streptavidine-PE ou de streptavidine-APC mixée avec chaque complexe monomérique [Mamu-A*01/peptide/ β 2m] biotinylé, à un ratio molaire de 1:4, comme il a été précédemment décrit^{142,156,158,229}.

A.



B.

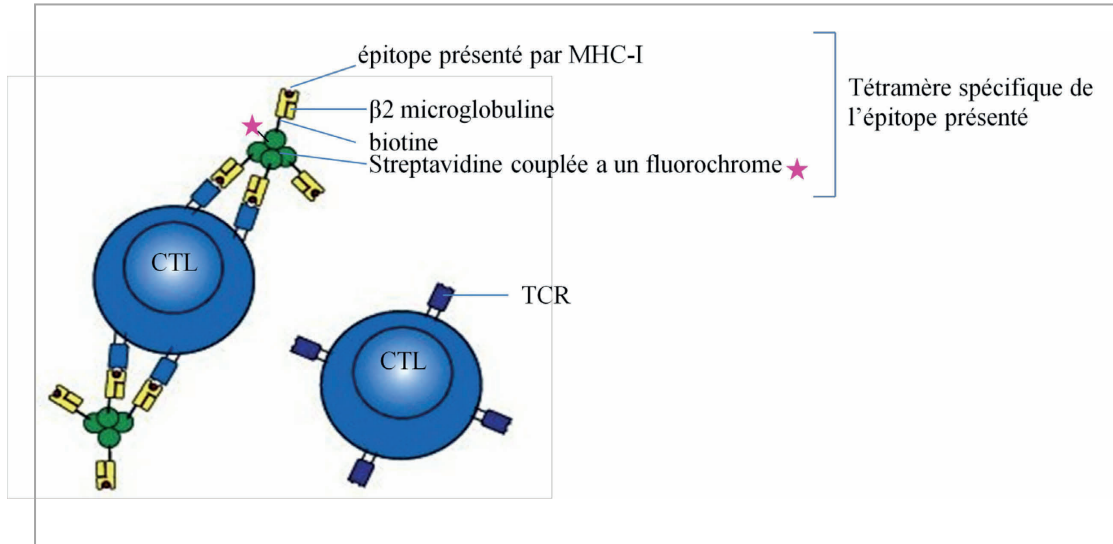


Figure 29 : Usage de tétramères pour marquer des lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un épitope. A. Fabrication de tétramère ; B. Marquage. (SA : streptavidine ; BSP : BirA substrate peptide ; F : Fluorochrome).

III.2. Culture cellulaire et stimulation peptidique de PBMC

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à partir de prélèvements sanguins des singes vaccinés ou non, à différents moments, après vaccination et après infection. Ces cellules ont été séparées en utilisant du Ficoll-Paque et ont été conservées dans de l'azote liquide à -130°C.

Tous les variants peptidiques de p41A ont été fournis par *New England peptide LLC*. Ces peptides lyophilisés ont été dissouts dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), dilués à une concentration stock de 10mg/ml, aliquotés et congelés à -80°C. Avant utilisation, les peptides ont été dilués dans du milieu de culture (RPMI 1640) supplémenté en glutamine, streptomycine, gentamycine et avec 12% de sérum fœtal de veau.

Les PBMC décongelées ont été maintenues en culture en présence d'IL-2 et stimulées par chaque variant peptidique de p41A, puis récoltées après 12 à 14 jours en culture.

III.3. Identification de CTL capables d'interagir avec des tétramères spécifiques d'un variant de p41A : Immunophénotypage (1)

Dans un premier temps, les PBMC ont été incubées avec des tétramères spécifiques de chaque variant de p41A, à température ambiante pendant 15 minutes, et ensuite avec un mélange d'anticorps anti-CD3/anti-CD8 pendant 15 minutes. L'utilisation d'un cytomètre de flux FACS Calibur (BD Biosciences) a permis d'isoler

chaque population de lymphocytes T CD3+CD8+ variant de p41A+, à un taux de pureté égal à 98%.

Le panel de tétramères et d'anticorps suivant a été utilisé pour le marquage des cellules:

| Tétramères | Fluorochromes |
|---------------------------------------|----------------------|
| MamuA*01/ HxB2-p41A /β2m | PE ou APC |
| MamuA*01/ 89.6P-p41A /β2m | PE ou APC |
| MamuA*01/ variant 1-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 3-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 5-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 6-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 8-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 12-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 16-p41A /β2m | APC |

| Anticorps monoclonaux spécifiques de | Fluorochromes |
|---|----------------------|
| CD3 | PerCP cy5.5 |
| CD8 αβ | FITC |

(PerCP: Périidine chlorophylle; FITC: Fluorescéine isothioscyanate; APC: Allophycocyanine)

III.4. Mesure du potentiel cross-réactif de CTL capables de reconnaître des variants de p41A: double marquage - Immunophénotypage (2)

Afin d'évaluer la capacité des CTL, élicités après immunisations utilisant l'enveloppe comme immunogène ou après infections de singes rhésus Mamu-A*01+, à reconnaître divers isolats du VIH-1, la même procédure de culture présentée précédemment a été suivie. Différents types de stimulations ont été testées:

- Stimulation par chaque variant de p41A : Cette stimulation suivie d'un double marquage [tétramères spécifiques du variant utilisé pour la stimulation et tétramères spécifiques du clade B-p41A] a été pratiquée pour explorer les capacités d'une population de lymphocytes spécifiques à un variant de p41A à reconnaître un épitope qui dérive de la dégradation de l'immunogène (SHIV-89.6P Env) ou d'une autre forme du clade B de l'enveloppe du VIH-1 (HxB2 Env).

- Stimulation par 89.6P-p41A : Après vaccination, cette stimulation suivie du double marquage par des tétramères spécifiques de 89.6P-p41A et de tétramères spécifiques d'un autre variant de p41A permet de savoir si une population de lymphocytes élicités par une vaccination qui utilise la forme SHIV89.6P de l'enveloppe du virus peut reconnaître l'épitope issu de la dégradation de cet immunogène (89.6P-p41A) mais aussi des formes divergentes de ce nonamère (qui varient par un ou deux acides aminés) issues de la dégradation de l'enveloppe d'autres clades du VIH-1.

- Stimulation par HxB2-p41A: Après vaccination, cette stimulation suivie du double marquage par des tétramères spécifiques de HxB2-p41A et de tétramères spécifiques d'un autre variant de p41A permet de savoir si une population de lymphocytes, capable de reconnaître un épitope qui varie par un acide aminé par rapport à celui issu de la dégradation de l'immunogène utilisé pour vacciner les singes, est aussi capable de reconnaître d'autres variants qui diffèrent par un ou deux acides aminés.

Après infection, les mêmes types de stimulations et de marquages ont été effectués. Ils permettent d'évaluer, d'une part le maintien des différentes populations de lymphocytes spécifiques à chaque variant de p41A générées après vaccination, et d'autre part le phénomène de sélection de certaines populations en phase chronique de l'infection.

En pratique, pour chaque type de stimulation, deux types de double marquage ont été réalisés en utilisant des tétramères spécifiques aux variants de p41A relatifs au clade B de l'enveloppe du VIH-1 mélangés avec des tétramères spécifiques de chaque autre variant de p41A:

1er double marquage : Identification de lymphocytes capables d'interagir avec des tétramères spécifiques de 89.6P-p41A et d'un autre variant de p41A

| Tétramères | Fluorochrome |
|----------------------------------|--------------|
| MamuA*01/ 89.6P-p41A /β2m | PE |

↓
 Variant de p41A, épitope issu de la dégradation de la forme chimérique de l'enveloppe utilisée comme immunogène.

X

| un des tétramères suivants | Fluorochrome |
|---------------------------------------|--------------|
| MamuA*01/ HxB2-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 1-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 3-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 5-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 6-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 8-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 12-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 16-p41A /β2m | APC |

2ème double marquage : Identification de lymphocytes capables d'interagir avec des tétramères spécifiques de HxB2-p41A et d'un autre variant de p41A.

| Tétramères | Fluorochrome |
|---------------------------------|--------------|
| MamuA*01/ HxB2-p41A /β2m | PE |

↓
 Variant de p41A, épitope issu de la dégradation de l'enveloppe du VIH-1 (clade B).

X

| un des tétramères suivants | Fluorochrome |
|---------------------------------------|--------------|
| MamuA*01/ 89.6P-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 1-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 3-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 5-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 6-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 8-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 12-p41A /β2m | APC |
| MamuA*01/ variant 16-p41A /β2m | APC |

IV. Etude de la diversité clonale de CTL générés chez des singes rhésus Mamu-A*01+, vaccinés avec l'enveloppe du VIH-1 ou après infection par SHIV

Chaque population spécifique d'un variant de p41A a été identifiée par sa capacité à se lier à des tétramères construits avec ce variant peptidique et a été isolée par cytométrie de flux.

Dans le but d'évaluer la diversité clonale de CTL capables de reconnaître un variant de p41A, **chaque population a été caractérisée par:**

- son **V β répertoire** : chaque CTL exprime un certain nombre de gènes de différentes familles ou sous familles codant pour la chaîne β du récepteur de la cellule T.

L'ensemble des gènes exprimés constitue le **V β répertoire** de cette population de lymphocytes spécifiques d'un variant de p41A. Il peut être restreint (si un ou deux gènes V β sont exprimés) ou large (si un nombre plus important de gènes V β est exprimé).

- la **séquence de la région complémentaire déterminante 3 (CDR3) du TCR β** :

Unique à chaque CTL, elle interagit directement avec la séquence nonamérique de l'épitope, et est donc impliquée dans sa reconnaissance.

IV.1. Réalisation d'une banque d'ADNc relatifs à chaque population de lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un variant de p41A

Afin d'évaluer le β V répertoire et de clonotyper chaque population de lymphocytes spécifique d'un variant de p41A, l'extraction des ARN totaux de chaque population de lymphocytes CD3+CD8+variant de p41A+ préalablement isolée par cytométrie en flux, a été réalisée en suivant les instructions fournies dans le kit d'extraction *RNeasy Mini extraction kit* (Qiagen). La réaction de synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) simple brin a été catalysée par la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney à partir des ARN extraits, avec le 3' SMART CDS amorce IIA et des amorces oligonucléotidiques fournies dans le kit *Super SMART PCR cDNA synthesis* (Clontech). Les ADNc double brin, relatifs aux populations lymphocytaires spécifiques de variants de p41A, ont été préamplifiés par 10 à 25 cycles de PCR utilisant une amorce-5' et les réactifs fournis aussi dans le kit. Le nombre optimal de cycles de préamplification a été déterminé par un *test run* en présence de SYBR green qui fournit le nombre maximal de cycles de PCR possible en restant dans une gamme/plage d'amplification log-linéaire¹⁸³. Les ADN double brin relatifs de chaque population spécifique d'un variant de p41A ont été regroupés dans une banque qui a été utilisée pour évaluer leur β V répertoire et identifier les clonotypes impliqués dans la reconnaissance de ces variants par le séquençage des CDR3 du TCR β .

IV.2. V β répertoire de chaque population de lymphocytes T CD8+ spécifiques d'un variant de p41A

Les amorces utilisées pour quantifier le nombre de familles et sous familles codant pour la chaîne β du récepteur de la cellule T et pour séquencer le CDR3 du TCR β ont été précédemment décrites¹⁸⁹. Elles ont été obtenues de *Biosource International*, manufacturées par *Keystone Labs* et purifiées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Les sondes Taqman ont été synthétisées à *Bioresearch Technologies* et purifiées par HPLC. Les amorces spécifiques de la région variable et de la région constante de la chaîne β du TCR ont été conçues à partir des séquences du TCR β du singe rhésus obtenues de *GenBank*.

PCR quantitative

Les ADNc double brin dérivés de chaque échantillon de lymphocytes CD3+CD8+variant de p41A+ ont été également distribués dans 48 réactions individuelles de PCR. Chaque réaction comprend une amorce sens spécifique d'une famille ou sous famille de gènes codant pour la chaîne variable β du TCR, et une amorce anti-sens spécifique de la chaîne constante C β et une sonde C β *TaqMan*. L'amplification a été réalisée par la Stuart Taq polymérase, sur une plaque de 96 puits (46 réactions en duplicat et deux contrôles), dans une machine de PCR quantitative MX4000 (Stratagene) sous les conditions suivantes: 10 minutes à 95°C suivies de 50 cycles de PCR [10 secondes à 95°C, 30 secondes à 58°C /lecture de la fluorescence/ puis 30 secondes à 72°C]. Le nombre de copies de chaque gène Vbx exprimé par une

population de lymphocytes CD3+CD8+variant de p41A+ est divisé par le nombre total de copies de tous les gènes Vb exprimés par cette population, et multipliée par 100. Ainsi, le pourcentage associé à un gène Vbx est lié à sa contribution au Vb répertoire de cette population de lymphocytes. Les valeurs du bruit de fond pour ces expériences de PCR quantitative amplifiant les familles de gènes codant pour la chaîne variable β du TCR sont en moyennéquivalentes à 0.7% du nombre total de copies dans une série de réactions. Pour tout pourcentage supérieur à 0.7%, un gène Vbx est considéré comme partie intégrante du Vb répertoire de la population de lymphocytes testée.

IV.3. Clonotypage des CTL par le séquençage des CDR3 du TCR β impliqué dans la reconnaissance de l'épitope

Dans la première étude (Résultats, Article 1), les CDR3 associés aux gènes Vb7 et Vb13C2, exprimés par des lymphocytes CD3+CD8+89.6P-p41A+ et par des lymphocytes CD3+CD8+clade C-p41A+ ont été séquencés dans le but de comprendre pourquoi, chez des singes vaccinés avec le clade C de l'enveloppe du VIH-1 comme immunogène, deux populations de lymphocytes qui présentent un répertoire restreint à un seul et même gène Vb, n'ont pas la même capacité à reconnaître deux variants de p41A (YAPPISGTI, 89.6P-p41A relatif au clade B de l'enveloppe du VIH-1, et YAPPIAGNI, relatif au clade C de l'enveloppe du VIH-1).

Dans la deuxième étude (Résultats, Article 2), les CDR3 associés aux familles de gènes Vb exprimées par plus de trois populations différentes de lymphocytes T CD3+CD8+ variant de p41A+, observées après immunisation des singes et isolées, ont été séquencées afin de définir les clonotypes capables de reconnaître les différents variants de p41A testés dans cette étude. Aussi, les CDR3 relatifs aux gènes majeurs Vbx (associés au plus fort %) constitutifs du Vb répertoire de chaque population spécifique d'un variant de p41A, observée après infection des singes préalablement vaccinés, et isolée, ont été séquencés afin d'identifier les clonotypes maintenus après infection.

Amplification et clonage

L'ADNc double brin relatif à chaque population spécifique d'un variant de p41A, précédemment utilisé pour déterminer leur Vb répertoire, a été soumis à une seconde série de réactions d'amplification par PCR utilisant des amorces sens spécifiques des gènes Vb 4, 7B, 12.3, 13A, 13C1, 13C2 ou 23 et une amorce anti-sens spécifique du gène Cb. L'ADNc a été amplifié sur *Perkin Elmer 9600 GeneAmp PCR system* sous les conditions suivantes : 95°C pour 10 min; 35 cycles : 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 58°C et 30 secondes à 72°C. Les produits de PCR ont été purifiés suivant les instructions fournies dans le *MiniElute Reaction cleanup kit* (Qiagen), puis clonés en utilisant le *pGEM T-easy system* (Promega). Les amorces T7 et SP6 ont permis de séquencer la (les) région(s) complémentaire (s) déterminante(s) CDR3 capable(s) d'interagir avec des variants de p41A.

V. Etude fonctionnelle des lymphocytes T spécifiques de différents variants de p41A générés après immunisations et infections de singes rhésus Mamu-A*01+

La reconnaissance du complexe [Mamu-A*01/épitope/ β 2m] par le CDR3 d'un lymphocyte T conduit en général à son activation. Celle-ci peut être mesurée notamment par la quantité de cytokines produites par la cellule activée.

V.1. IFN- γ ELISpot

L'évaluation de la proportion de cellules T actives est réalisée par stimulation de PBMC *in vitro* avec l'antigène ou un cocktail d'antigènes. Pendant l'incubation les cellules sédimentent dans une plaque couverte d'anticorps spécifiques à l'IFN- γ . Quand une cellule T activée secrète cette cytokine, elle est alors captée par les anticorps fixés sur la plaque. Après élimination des cellules, l'immunocomplexe est révélé par une méthode ELISA utilisant un substrat chromogène insoluble, dont la précipitation localisée génère des taches colorées ou immunospots. Le nombre de spots révélé par cette technique comparé au nombre de PBMC testées permet de calculer la proportion de cellules T activées pour chaque échantillon testé.

Dans l'Article 1, la fonction de PBMC de singes vaccinés avec l'enveloppe du VIH-1 (clade B ou clade C) comme immunogène a été évaluée en mesurant leurs réponses spécifiques contre l'épitope relatif à l'immunogène (HxB2-p41A ou le clade C-p41A) par le nombre d'immunospots associé à la sécrétion d'IFN- γ des cellules activées. Les PBMC ont été isolées 27 semaines après la 1ère immunisation des singes, une semaine après le rappel. La stimulation de 2×10^5 cellules a été réalisée en utilisant 1 μ g/ml du peptide HxB2-p41A ou du clade C-p41A (en triplicat). Un

échantillon contenant seulement du milieu de culture a été utilisé comme contrôle négatif. Le nombre moyen de spots par triplicat a été calculé pour chaque animal et ajusté pour représenter le nombre moyen de spots par 10^6 PBMC.

V.2. Marquage intracellulaire des cytokines (ICS) (Figures 30 et 31)

De nombreuses publications proposent cette technique pour définir le phénotype et évaluer la fonction des CTL²³⁰⁻²³⁶.

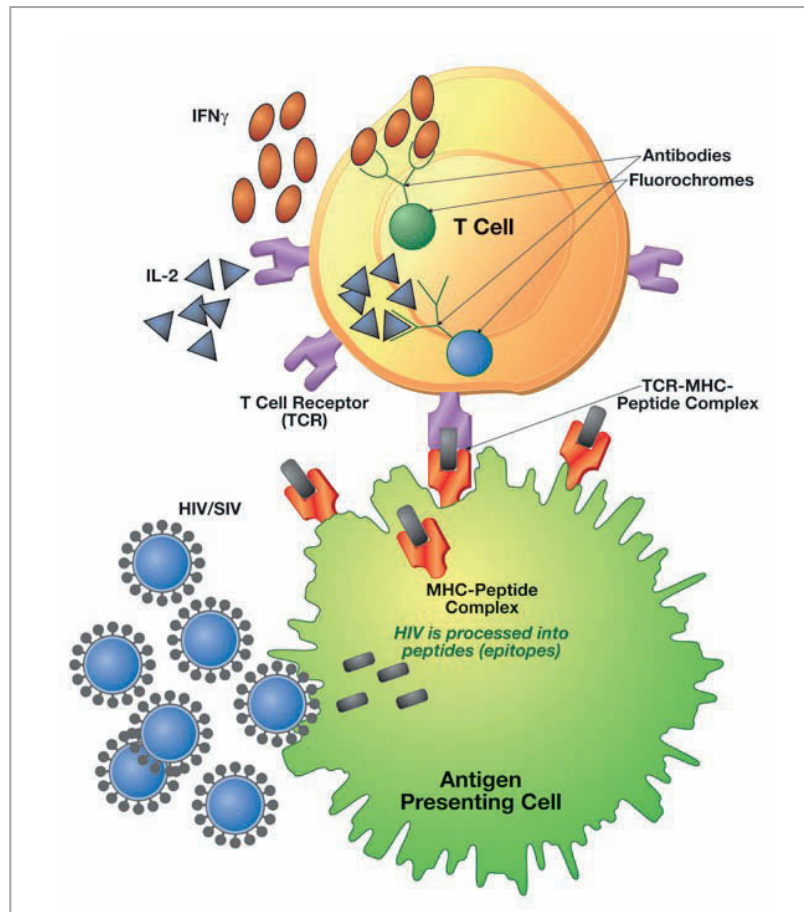


Figure 30 : Marquage intracellulaire de l'IFN- γ et IL-2 (rapport du iavi par Mc Dermott et Cohen)¹⁵⁴

Le marquage intracellulaire est basé sur l'utilisation de poisons métaboliques qui inhibent l'exportation des protéines de la cellule. Les cytokines produites par un lymphocyte T activé suite à la reconnaissance d'un épitope s'accumulent donc dans le réticulum endoplasmique et le réseau vésiculaire de la cellule. La fixation et la perméabilisation des cellules par des détergents doux permettent aux anticorps spécifiques à l'IFN- γ , à TNF - α et à l'IL2 d'accéder aux compartiments intracellulaires et de se lier aux cytokines qui sont alors détectables par cytométrie en flux. Les cellules peuvent aussi être identifiées avec d'autres marqueurs (CD) comme les CD4, CD3, CD8 et par des tétramères spécifiques de l'épitope précédemment utilisé pour stimuler les PBMC.

Ainsi, il est possible d'évaluer le pourcentage d'une population de CTL capable de reconnaître un variant de p41A et de produire une ou plusieurs des cytokines testées.

Dans l'Article 2, la mesure de l'activation des lymphocytes spécifiques de chaque variant de p41A a été étendue à l'évaluation de la production de deux molécules en plus de l'IFN- γ : TNF- α et IL-2.

V.2.1. Culture cellulaire et stimulation des PBMC

Les PBMC isolées à partir du sang de singes rhésus Mamu-A*01+, après vaccination avec la forme SHIV89.6P de l'enveloppe du virus, et après infection des singes par SHIV-KB9, ont été cryopréservées. Plus tard, les cellules ont été décongelées et maintenues au repos pendant une heure à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Deux millions de lymphocytes par échantillon ont été incubés pendant 6 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ suivant différentes conditions:

1. avec du milieu de culture seul : contrôle négatif
2. avec du milieu de culture et des co-stimulateurs CD28 et CD49d : 2ème contrôle négatif
3. avec du milieu de culture et des co-stimulateurs CD28 et CD49d et chaque tétramère : pour quantifier un éventuel bruit de fond lié aux tétramères
4. avec du phorbol 12-myristade 13 acétate (PMA) et de la ionomycine : contrôle positif
5. avec p11C, épitope de Gag (SIV) : contrôle positif lié aux tétramères
6. avec un variant de p41A : Les variants de p41A pour lesquels ont été observés les plus forts pourcentages de lymphocytes CD3+CD8+tétramères+, après 12 jours en culture, ont été choisis pour cette expérience de marquage intracellulaire, soit les variants suivants:

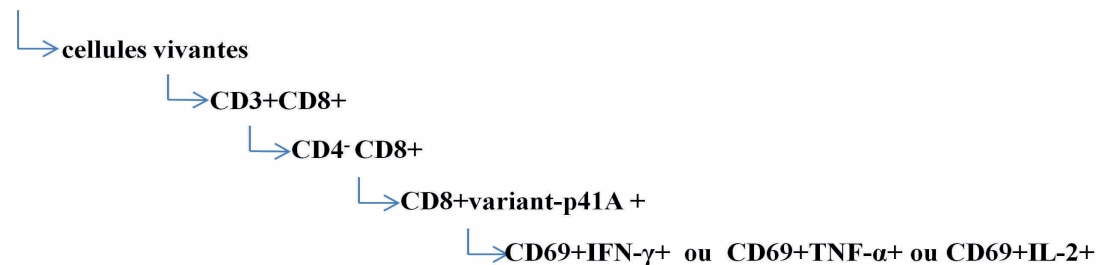
| Variants de p41A | Séquences de l'épitope | Sous-types de l'enveloppe (clade) |
|------------------|------------------------|-----------------------------------|
| HxB2 | YAPPI S GQI | B |
| SHIV-89.6P | YAPPI T GQI | B |
| Variant 1 | YAPPI A GNI | C, G, J |
| Variant 5 | YAPPI S GRI | 01_AE |
| Variant 8 | YAPPI A GQI | D |

Toutes les cultures contenaient des inhibiteurs de transport de protéines, la bréfeldine et la monensine (Golgi Plug/Golgi Stop, BD Bioscience) ainsi que 1 µg/ml de CD28 et 1 µg/ml de CD49d (co-stimulateurs).

V.2.2. Marquage des PBMC stimulées

Les cellules mortes sont exclues de l'analyse à l'aide d'un marqueur de viabilité (*aqua dead cell stain kit*, Invitrogen). Puis, une première incubation avec des tétramères spécifiques aux divers variants de p41A cités ci-dessus ou des tétramères spécifiques de p11C pour le contrôle positif "tétramères" a été réalisée. Elle est suivie par une seconde incubation avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Après fixation et perméabilisation des cellules, un autre cocktail d'anticorps a été utilisé contre les CD3, CD69, IFN- γ , TNF- α et IL-2. Les cellules ont alors été fixées dans 2% de formaldéhyde. Les échantillons ont été collectés par un cytomètre de flux LSR II Instrument (BD biosciences) et analysés par le logiciel FlowJo (version 8.8.6).

Les lymphocytes activés par la stimulation d'un variant de p41A sont identifiés par leur interaction avec des tétramères spécifiques du variant de p41A utilisé pour la stimulation. Leur phénotype a été défini selon la hiérarchie suivante :



A. Panel

| | Fluorochromes |
|-------------------------|---------------|
| Dead cells | Amcyan |
| CD4 | PerCP-Cy5.5 |
| CD8 | APC Cy7 |
| CD3 | Pacific Blue |
| IFN- γ | PE Cy7 |
| TNF- α | FITC |
| IL-2 | APC |
| CD69 | ECD |
| Tétramères-variant-p41A | PE |

B. Procédure

1. Stimulation pendant 6 heures de $2 \cdot 10^6$ PBMC par un variant de p41A
2. Coloration avec un **marqueur de viabilité** des cellules
3. Marquage des cellules interagissant avec des **tétramères spécifiques aux variants de p41A** utilisés pour stimuler les PBMC
4. Marquage des **CD4 et CD8**
5. Perméabilisation des cellules
6. Marquage "intracellulaire": des **CD3, CD69, IFN-g, TNF-a, IL-2**
7. Fixation des cellules
8. Collection des échantillons et analyse par cytométrie de flux

C. Stratégie d'analyse des échantillons

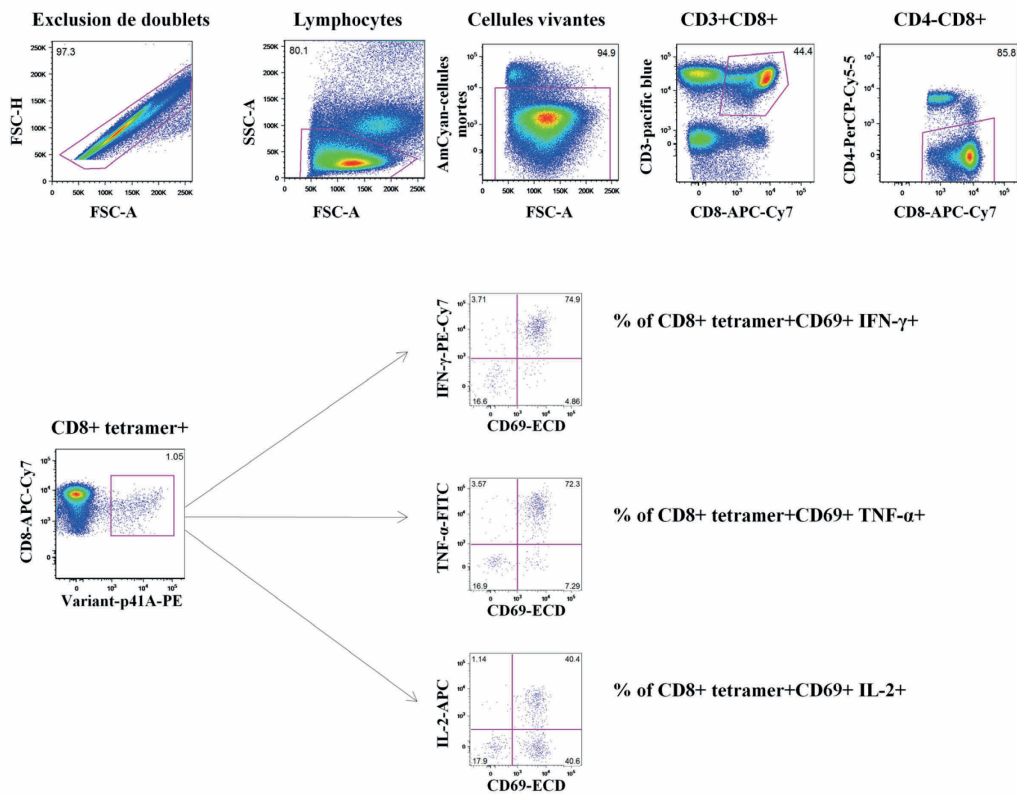


Figure 31 : Procédure du marquage intracellulaire utilisé pour identifier les lymphocytes capables de reconnaître des variants de p41A et de produire des cytokines.

RESULTATS

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont conduit à la publication de deux articles dans le *Journal of Virology* et à la soumission d'un article au journal *Nature Immunology*.

Article 1 publié dans *Journal of virology* (Hulot et al., 2009)²³⁷

Cet article présente les résultats d'une étude qui porte sur trois vaccins contre le VIH-1 testés chez des singes rhésus Mamu-A01+. Chaque vaccin utilisait l'enveloppe d'un sous-type du VIH-1 comme immunogène : 89.6P Env, HxB2 Env (clade B), ou clade C Env. La réponse immunitaire induite par ces vaccins a été mesurée par l'étude de la clonalité des lymphocytes T CD8+ générés par la vaccination, et après infection des singes par le virus chimérique SHIV89.6P. Des tétramères spécifiques de variants peptidiques d'un épitope de l'enveloppe (p41A) ont été utilisés pour identifier des populations de lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître un ou plusieurs de ces variants de p41A (89.6P-p41A, HxB2-p41A et clade C-p41A). Les populations de lymphocytes T CD8+ spécifiques de chaque variant de p41A ont été caractérisées par l'analyse de leur V β répertoire et par le séquençage de CDR3 du TCR β .

Article 2 soumis au journal *Nature Immunology*

L'étude précédente a montré que les vaccinations qui utilisent 89.6P Env et HxB2 Env conduisent à des réponses cellulaires comparables. Des lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître les 3 variants de p41A testés ont été identifiés. Cette reconnaissance est réalisée par un large usage de différentes familles β . α V l'inverse, la vaccination utilisant le clade C de l'enveloppe conduit à une plus faible

réponse des lymphocytes T CD8⁺ qui sont pas ou peu cross-réactifs. De plus, les deux singes testés ont présenté des réponses opposées.

La deuxième étude a donc été restreinte au groupe de singes rhésus vaccinés avec 89.6P Env. La réponse immunitaire des lymphocytes T CD8⁺ observée chez ces singes vaccinés a été comparée à celle observée dans un groupe de singes non vaccinés et infectés par SHIV. Aussi, l'étude de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ a été étendue à la reconnaissance de 9 variants peptidiques de p41A qui couvrent les 11 clades du VIH-1 responsables de la pandémie du SIDA. Le potentiel cross-réactif des lymphocytes T CD8⁺ a été évalué par des marquages avec des tétramères spécifiques des 9 variants de p41A. Les populations de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de chaque variant ont été caractérisées par l'analyse de leur répertoire et par le séquençage de 8112 séquences CDR3 du TCR β . La fonctionnalité de ces populations de lymphocytes T CD8⁺ a été également mesurée.

Article 3 publié dans *Journal of virology* (Manuel et al., 2009)¹⁷³ présenté dans la section "Annexes "

J'ai participé à cette étude réalisée en partie sur la cohorte de singes déjà impliquée dans les deux études précédentes. Il s'agissait de comparer la réponse des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de p41A avec celle des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un autre épitope, p11C issu de Gag, dans différentes conditions.

Article 1

Sandrine L. Hulot, Michael S. Seaman, Pritha Sen, Patrick A. Autissier,
Edwin R. Manuel, Norman L. Letvin.

**Diverse cross-reactive potential and V β gene usage of an epitope
specific CTL population in monkeys immunized with diverse HIV-1
Env immunogens. J Virol. 2009 Oct;83(19):9803-12**

RESUME

Un vaccin idéal contre le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 éliciterait des réponses immunitaires cellulaire et humorale contre diverses souches du virus. Dans cette étude, la cytométrie en flux, l'analyse du V β répertoire, le séquençage de régions complémentaires déterminantes 3 du TCR β ont été combinées pour déterminer la clonalité des lymphocytes T CD8⁺ impliqués dans la reconnaissance de variants peptidiques d'un épitope, p41A. Ces lymphocytes T CD8⁺ ont été élicités chez des singes rhésus Mamu-A*01⁺ vaccinés avec l'enveloppe (Env) de diverses formes du VIH-1. L'immunisation des singes rhésus avec l'enveloppe du clade B a permis de générer des lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître 3 variants de p41A : 89.6P-p41A, HxB2-p41A du clade B de l'enveloppe et le clade C-p41A par l'intermédiaire de diverses familles de gènes codant pour la chaîne β du TCR (large V β répertoire). A l'inverse, chez les 2 singes vaccinés avec des séquences relatives au clade C de l'enveloppe du VIH-1, un des singes présentait des lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître les trois variants de p41A testés, alors que l'autre ne présentait pas de lymphocytes T CD8⁺ cross-réactifs. Ces résultats démontrent que la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à reconnaître divers variants d'un épitope diffère entre des singes rhésus qui partagent le même complexe majeur d'histocompatibilité (Mamu-A*01) et qui ont reçu le même vaccin.

Diverse Cross-Reactive Potential and V β Gene Usage of an Epitope-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Population in Monkeys Immunized with Diverse Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Immunogens[∇]

Sandrine L. Hulot, Michael S. Seaman, Pritha Sen, Patrick A. Autissier, Edwin R. Manuel, and Norman L. Letvin*

Division of Viral Pathogenesis, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, 330 Brookline Ave., Boston, Massachusetts 02215

Received 16 April 2009/Accepted 16 July 2009

An ideal human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine would elicit potent cellular and humoral immune responses that recognize diverse strains of the virus. In the present study, combined methodologies (flow cytometry, V β repertoire analysis, and complementarity-determining region 3 sequencing) were used to determine the clonality of CD8⁺ T lymphocytes taking part in the recognition of variant epitope peptides elicited in Mamu-A*01-positive rhesus monkeys immunized with vaccines encoding diverse HIV-1 envelopes (Envs). Monkeys immunized with clade B Envs generated CD8⁺ T lymphocytes that cross-recognized both clade B- and clade C-p41A epitope peptides using a large degree of diversity in V β gene usage. However, with two monkeys immunized with clade C Env, one monkey exhibited p41A-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) with the capacity for cross-recognition of variant epitopes, while the other monkey did not. These studies demonstrate that the cross-reactive potential of variant p41A epitope peptide-specific CTL populations can differ between monkeys that share the same restricting major histocompatibility complex class I molecule and receive the same vaccine immunogens.

The ability of the immune system to contain the replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is complicated by the extraordinary capacity of the virus to generate mutations (19). Mutations are rapidly generated by the replicating virus because of its inefficient reverse transcriptase (27) and its tendency to recombine with related virus forms (34). Certain newly generated viruses are selected because of a replication fitness advantage (4, 7, 10). Importantly, the accrual of mutations by replicating HIV-1 also provides a survival advantage to the virus in that it facilitates virus escape from immune recognition (4, 12, 21, 25). Much of the sequence heterogeneity in circulating strains of HIV-1 has arisen because of this ongoing genetic evolution of the virus (6).

The definition of how CD8⁺ T lymphocytes recognize mutant and divergent forms of HIV-1 will inform both our understanding of the immunopathogenesis of HIV-1 infections and strategies for developing an effective HIV-1 vaccine (22). CD8⁺ T lymphocytes play a central role in containing HIV-1 replication during the period of primary infection (5, 15, 17, 23) and in chronically infected individuals (9, 11, 24, 30). The diversity of variant viruses recognized by individual clones of CD8⁺ T lymphocytes should impact the immune control of HIV-1. Moreover, the clonal diversity of an HIV-1-specific

CD8⁺ T-lymphocyte response either generated by vaccination or elicited by the replicating virus should contribute to containing the emergence of mutant forms of the virus that can evade immune recognition (22, 26, 31).

The present studies were initiated to characterize at a clonal level CD8⁺ T-lymphocyte recognition of variant forms of the HIV-1 envelope (Env) in vaccinated and infected rhesus monkeys. These studies were done with monkeys selected to express the major histocompatibility complex (MHC) class I allele *Mamu-A*01*, and the Env region studied was the well-characterized HIV-1 V3 loop epitope p41A (8). CD8⁺ T-lymphocyte recognition of variant forms of the p41A epitope was evaluated using tetramers constructed with Mamu-A*01 and variant epitope peptides, and the clonal constituents of the responding CD8⁺ T lymphocytes were assessed by T-cell receptor V β (TCR V β) repertoire analysis and selected complementarity-determining region 3 (CDR3) sequencing. These studies demonstrate that monkeys sharing the same MHC class I molecule and receiving the same vaccine immunogens can elicit p41A epitope peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte populations which exhibit differences in the ability to cross-react to variant epitopes.

MATERIALS AND METHODS

Immunizations and challenge of rhesus monkeys. Seven adult Indian-origin rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) were maintained in a facility accredited by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee for Harvard Medical School and the *Guide for the Care and Use of*

* Corresponding author. Mailing address: Beth Israel Deaconess Medical Center, Division of Viral Pathogenesis, 330 Brookline Ave., Boston, MA 02215. Phone: (617) 735-4400. Fax: (617) 735-4527. E-mail: nletvin@bidmc.harvard.edu.

[∇] Published ahead of print on 29 July 2009.

TABLE 1. Sequences of nonamer peptides used to stimulate and stain p41A epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes

| HIV-1 Env peptide (clade) | p41A epitope sequence ^a |
|---------------------------|------------------------------------|
| HxB2 (B) | YAPPISGQI |
| 89.6P (B) | YAPPITGQI |
| 97ZA012 (C) | YAPPIAGNI |

^a The amino acids that represent a divergence from the HxB2-p41a epitope sequence are in boldface.

Laboratory Animals (23a). All monkeys expressed the MHC class I allele *Mamu-A*01*, as determined by PCR-based typing using allele-specific primers, as previously described (14, 17).

Monkeys were immunized using a DNA prime/recombinant adenovirus (rAd) boost vaccine regimen, including both SIVmac239 Gag-Pol-Nef and HIV-1 Env immunogens. A group of three monkeys (AW13, AW2P, and AW28) was vaccinated with 89.6P Env as previously described (29). Two monkeys were vaccinated with HxB2 Env (419 and VFA), and two others were vaccinated with clade C Env (414 and KPA), as previously described (31).

These monkeys were challenged intravenously with 1×10^8 RNA copies of either simian-human immunodeficiency virus (SHIV)-89.6P ($n = 4$), as previously described (31), or the KB9 clone of SHIV-89.6P ($n = 3$).

Antibodies, tetramers, and peptides. Antibodies used in this study were directly coupled to fluorescein isothiocyanate or PerCP Cy5.5. The following monoclonal antibodies were used: fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD8 $\alpha\beta$ (clone SK1; Becton Dickinson Pharmingen) and PerCP Cy5.5-conjugated anti-CD3 (clone SP34.2, Becton Dickinson Pharmingen). Mamu-A*01/HxB2-p41A/ β 2m, Mamu-A*01/clade C-p41A/ β 2m, and Mamu-A*01/89.6P-p41A/ β 2m tetramer complexes were prepared as previously described (8, 16). Streptavidin R-phycoerythrin or streptavidin-allophycocyanin (PhycoLink;

ProZyme) were mixed stepwise with biotinylated Mamu-A*01/epitope-peptide/ β 2m complexes at a molar ratio of 1:4 to produce the tetrameric complexes.

HxB2-p41A ([YAPPISGQI]), clade C-p41A ([YAPPIAGNI]), and 89.6P-p41A ([YAPPITGQI]) were obtained from New England Peptide, LLC. Lyophilized peptides were dissolved in dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), diluted to a stock peptide concentration of 10 mg/ml in water, and then frozen at -80°C in aliquots. Before use, peptides were diluted to a working concentration in RPMI 1640 medium (Mediatech, Herndon, VA) supplemented with glutamine, 12% fetal calf serum, streptomycin, and gentamicin.

IFN- γ ELISPOT assays. Gamma interferon (IFN- γ) enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays were performed as previously described (18). Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were plated in triplicate at 2×10^5 cells/well in a 100- μl final volume with either medium alone or the noted p41A variant peptides at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The mean number of spots from triplicate wells was calculated for each animal and adjusted to represent the mean number of spots per 10^6 PBMC.

Flow cytometry. PBMC were isolated from monkeys 27 to 290 weeks following DNA prime/rAd boost immunization and 20 to 28 weeks following SHIV-89.6P challenge, separated over a Ficoll layer (Ficoll-Paque Plus; Amersham Pharmacia Biotech), and cryopreserved.

Thawed PBMC cultured in the presence of interleukin-2 (IL-2) were stimulated by HxB2-p41A, clade C-p41A, or 89.6P-p41A peptide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), harvested on days 12 to 14, and separated using a prepreparation filter (Miltenyi Biotec). The cells were stained with combinations of Mamu-A*01/HxB2-p41A/ β 2m, Mamu-A*01/clade C-p41A/ β 2m, and Mamu-A*01/89.6P-p41A/ β 2m tetramers conjugated with phycoerythrin or allophycocyanin for 15 min at room temperature and then stained with a mixture of anti-CD3 and anti-CD8 monoclonal antibodies for 15 min. Samples were analyzed on a FACSVantage SE flow cytometer (BD Biosciences). CD3⁺ CD8⁺ HxB2-p41A⁺, CD3⁺ CD8⁺ clade C-p41A⁺, or CD3⁺ CD8⁺ 89.6P-p41A⁺ epitope-specific T-lymphocyte populations were sorted to a purity of at least 98%.

Generation of cDNA. RNA was extracted from either CD3⁺ CD8⁺ HxB2-p41A⁺, CD3⁺ CD8⁺ clade C-p41A⁺, or CD3⁺ CD8⁺ 89.6P-p41A⁺ epitope-

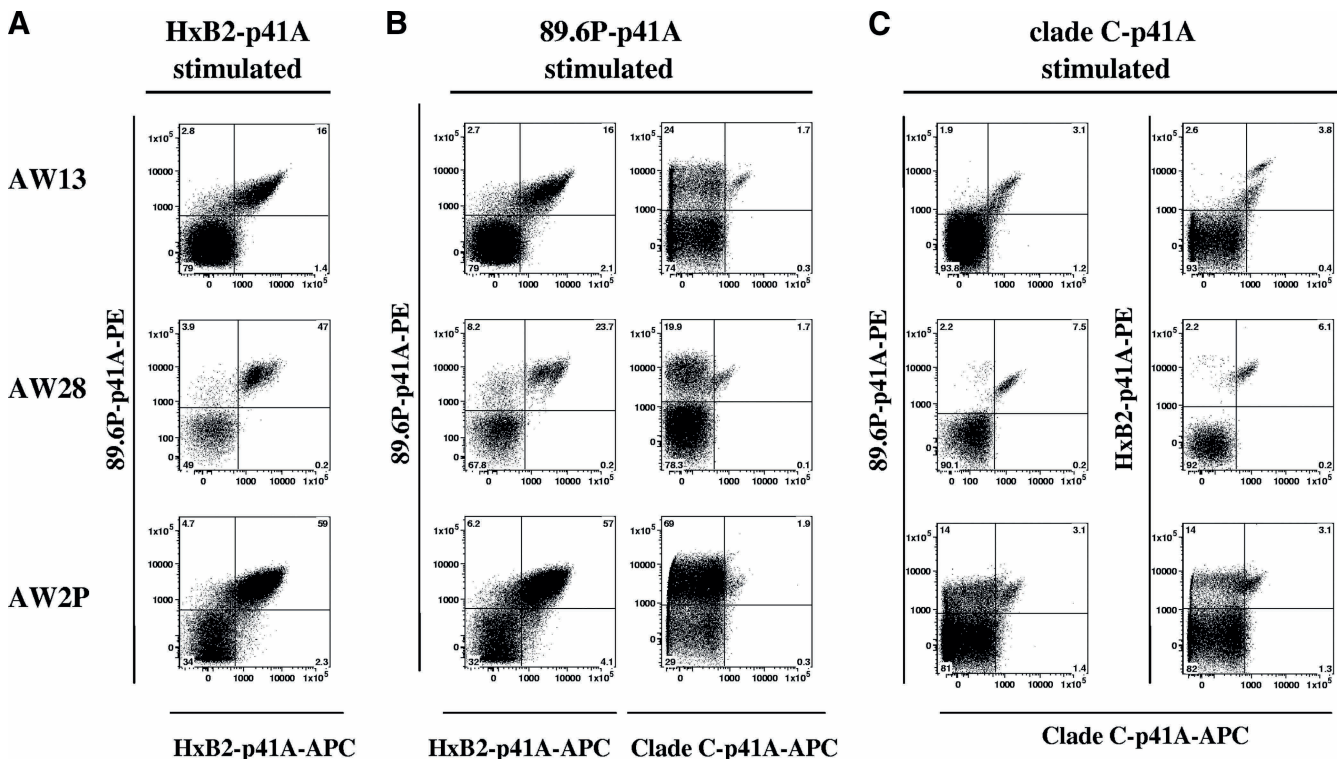


FIG. 1. Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in 89.6P Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys. PBMC were isolated from monkeys AW13, AW28, and AW2P following vaccination. Cells were stimulated in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with HxB2-p41A peptide (A), 89.6P-p41A peptide (B), or clade C-p41A peptide (C) and then double stained with HxB2-p41A and 89.6P-p41A tetramers, clade C-p41A and 89.6P-p41A tetramers, or HxB2-p41A and clade C-p41A tetramers. Data presented are dot plots gated on CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes, with the percentages of gated cells in each quadrant indicated. PE, phycoerythrin; APC, allophycocyanin.

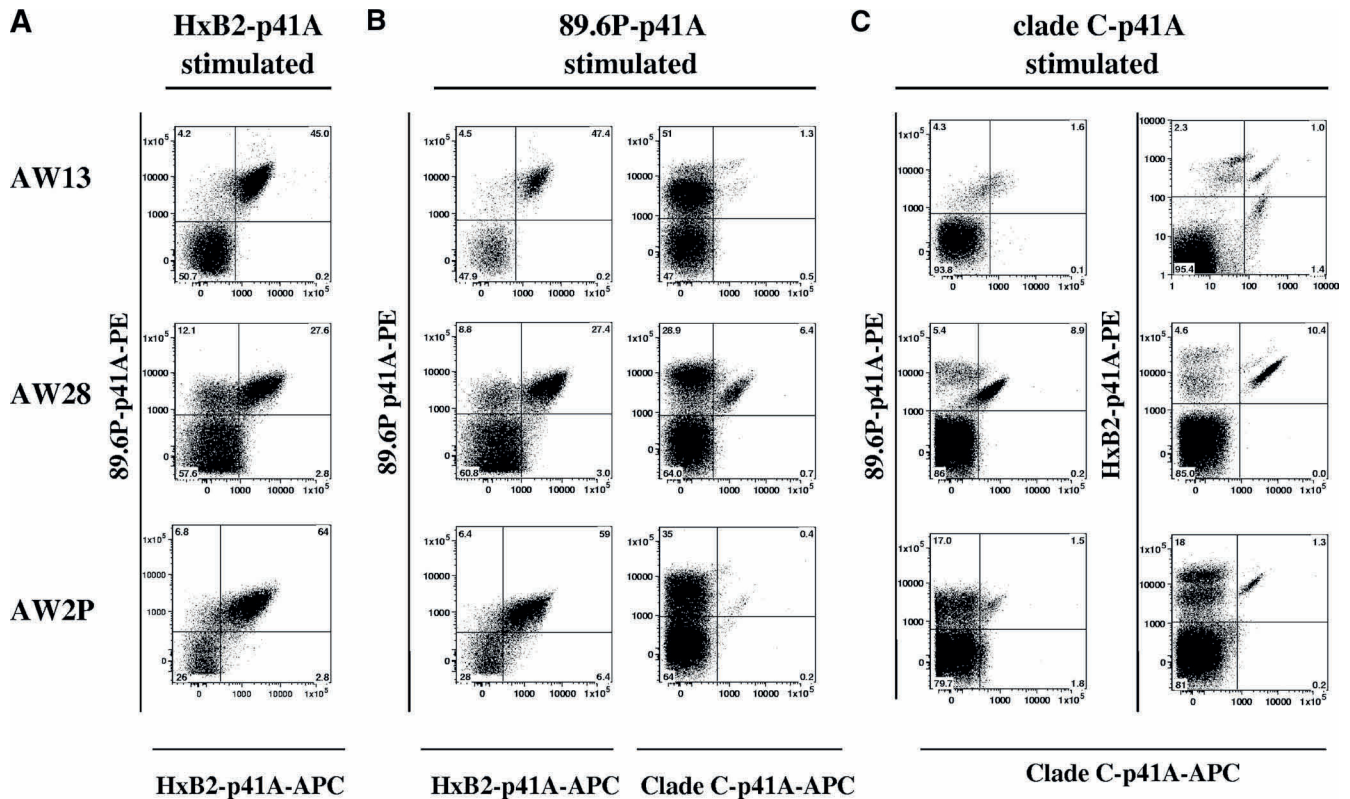


FIG. 2. Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in 89.6P Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys following SHIV-89.6P challenge. PBMC were isolated from monkeys AW13, AW28, and AW2P on day 142 following SHIV-89.6P challenge. Cells were stimulated *in vitro* for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with HxB2-p41A peptide (A), 89.6P-p41A peptide (B), or clade C-p41A peptide (C) and then double stained with HxB2-p41A and 89.6P-p41A tetramers, clade C-p41A and 89.6P-p41A tetramers, or HxB2-p41A and clade C-p41A tetramers. Data presented are dot plots gated on CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes, with the percentages of gated cells in each quadrant. PE, phycoerythrin; APC, allophycocyanin.

specific T-lymphocyte populations, according to the instructions supplied with the RNeasy extraction minikit from Qiagen. cDNA was then synthesized from the extracted RNA, as outlined in the Super SMART PCR cDNA synthesis kit from Clontech Laboratories. Briefly, the single-stranded cDNA reaction was catalyzed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase with the 3' SMART CDS primer II A and Smart II A oligonucleotide primers provided in the Super SMART cDNA synthesis kit. Preamplified, double-stranded cDNA libraries were made using 10 to 25 cycles of PCR amplification, utilizing the 5' PCR primer II A and reagents also provided in the Clontech kit. The optimal number of cycles of preamplification was determined by performing a test run in the presence of SYBR green to determine the maximum number of PCR cycles that could be performed in the log-linear amplification (20).

Primers and sequencing. High-performance liquid chromatography-purified primers used for the real-time PCR assay and sequencing (32) were obtained from BioSource International. Real-time TaqMan probes were synthesized at Biosearch Technologies, Inc. Primers specific for the variable and constant region of the TCRβ chain were designed from rhesus monkey TCR sequences obtained from GenBank and generated in our laboratory.

Quantitative PCR. cDNA derived from each sample was equally distributed into 48 individual PCRs. Each reaction contained a sense Vβ family-specific primer, an antisense Cβ-specific primer, and the TaqMan Cβ probe. PCRs were carried out using SureStart Taq (Stratagene). The real-time PCR was carried out for 50 cycles on an Mx4000 quantitative PCR machine (Stratagene) under the following conditions: 95°C for 10 min and 50 cycles of 95°C for 10 s, 58°C for 30 s, read fluorescence, and 72°C for 30 s. Background values for these Vβ quantitative PCR assays were, on average, 0.7% of the total copies in a series of reactions. Thus, we chose 0.7% as the threshold for considering a particular Vβ gene family as contributing to the effective Vβ repertoire of an epitope-specific CD8⁺ T-cell response.

Sequencing. The CDR3 of Vβ 7B and Vβ 13C.2 in cDNA samples from CD3⁺ CD8⁺ clade C-p41A⁻ and from CD3⁺ CD8⁺ 89.6P-p41A⁺-sorted T cells were

sequenced. cDNA generated for use in the quantitative PCR assays was used as a template for a second round of PCRs utilizing Vβ 7B or Vβ 13C.2 primers and a Cβ primer (BioSource International, Inc.). The cDNA was amplified for 35 cycles in a Perkin-Elmer 9600 GeneAmp PCR system under the following conditions: 95°C for 10 min and 50 cycles of 95°C for 10 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s. PCR products were purified using the MinElute reaction cleanup kit (Qiagen) by following the instructions from the manufacturer, cloned using the pGEM-T Easy system (Promega), and sequenced using a Cβ antisense primer for the determination of the CDR3 sequence. The CDR3 lengths were expressed as numbers of amino acids spanning the VDJ-joining segments.

RESULTS

Breadth of reactivity of Env-specific CD8⁺ T lymphocytes from HIV-1 89.6P Env-vaccinated and SHIV-89.6P-infected Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys. In view of the importance of the breadth of T-lymphocyte reactivity to contain the replication of variant forms of HIV-1, we sought first to characterize the cross-reactivity of CD8⁺ T lymphocytes of both 89.6P Env-vaccinated and SHIV-89.6P-infected Mamu-A*01-positive (Mamu-A*01⁺) rhesus monkeys. To facilitate these comparisons, we evaluated the CD8⁺ T-lymphocyte responses to three variant forms of the Mamu-A*01-restricted HIV-1 Env epitope p41A, consisting of two clade B epitope peptides (89.6P-p41A and HxB2-p41A) and one clade C epitope peptide (clade C-p41A) (Table 1). PBMC from three 89.6P Env-vaccinated monkeys (AW13, AW28, and AW2P) were stimu-

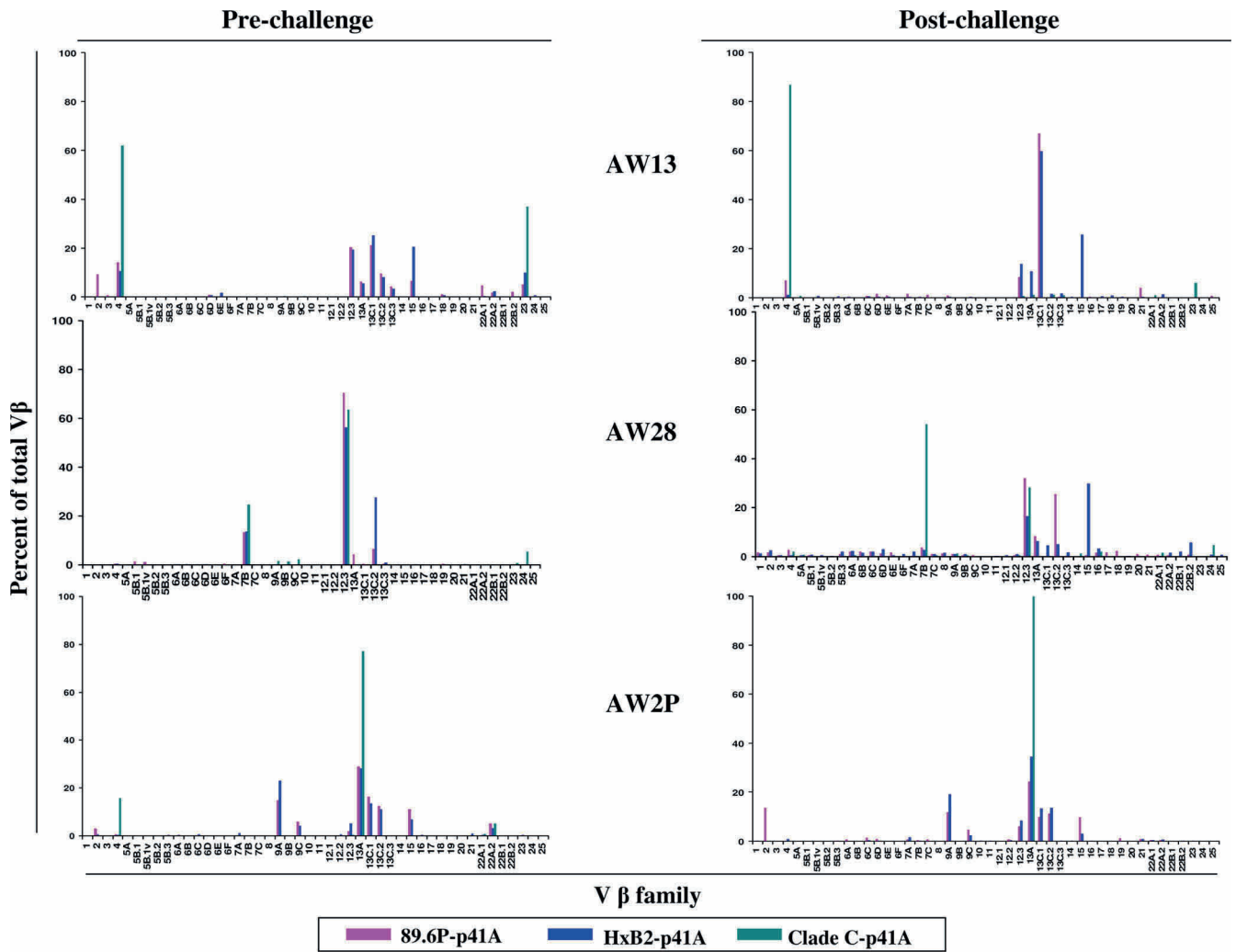


FIG. 3. V β repertoire analysis of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in 89.6P Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys following vaccination and challenge. PBMC were isolated from monkeys AW13, AW28, and AW2P following vaccination and on day 142 following SHIV-89.6P challenge. Cells were stimulated in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with HxB2-p41A peptide, clade C-p41A peptide, or 89.6P-p41A peptide and then double stained with HxB2-p41A and 89.6P-p41A tetramers, clade C-p41A and 89.6P-p41A tetramers, or HxB2-p41A and clade C-p41A tetramers. HxB2-p41A-, clade C-p41A-, and 89.6P-p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations were sorted. The RNA isolated from sorted p41A-specific T cells (CD3⁺, CD8⁺, and tetramer positive) was used to generate cDNA for V β repertoire analysis performed by real-time PCR using a C β primer and 46 primers specific for V β gene families. Data are presented as the percentages of total V β ($\frac{\text{number of copies of a V}\beta \text{ gene family} - \text{background}}{\text{number of copies of all V}\beta \text{ gene families} - \text{background}} \times 100$) for each V β gene family.

lated in vitro with either HxB2-p41A, 89.6P-p41A, or clade C-p41A epitope peptide, and each of these in vitro-expanded lymphocyte populations was assessed for binding to tetramers constructed with these same variant epitope peptides (Fig. 1). Following the in vitro stimulation of PBMC with HxB2-p41A, which is a clade B epitope sequence that differed by one amino acid from that used to immunize these three monkeys, the expanded CD8⁺ T-lymphocyte populations bound tetramers constructed with both of the prototype clade B epitope peptides, the HxB2 and the 89.6P forms of p41A (Fig. 1A). Following in vitro stimulation of the PBMC with the 89.6P-p41A epitope peptide, which is the same epitope peptide sequence used to immunize the monkeys, the expanded CD8⁺ T-lymphocyte populations bound tetramers constructed with the HxB2-form of p41A, and a small subset of these expanded

CD8⁺ T lymphocytes bound a tetramer constructed with the more distantly related clade C-p41A peptide (Fig. 1B). Finally, following in vitro stimulation of the PBMC with the clade C-p41A peptide, a small subset of the expanded CD8⁺ T-lymphocyte population bound to tetramers constructed with the 89.6P-p41A and HxB2-p41A peptides (Fig. 1C). Therefore, immunization with one form of the p41A peptide expanded CD8⁺ lymphocytes that recognize diverse forms of this epitope peptide.

A similar study was performed on PBMC from the same three monkeys after they were challenged with the chimeric virus SHIV-89.6P (Fig. 2). Cross-reactivity of the p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations was observed that was comparable to that observed following vaccination of these monkeys. Most of the p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes that

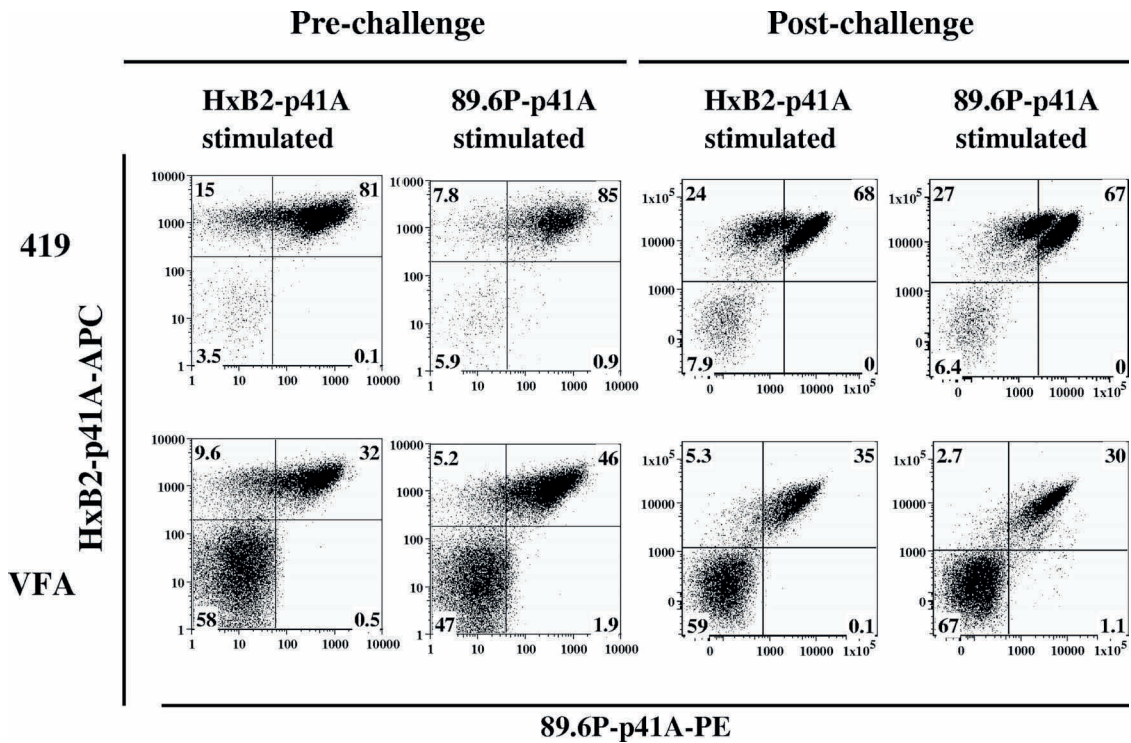


FIG. 4. Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in HxB2 Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys following vaccination and challenge. PBMC were isolated from monkeys 419 and VFA at week 27 following vaccination (1-week rAd boost) or week 28 following SHIV-89.6P challenge. Cells were stimulated in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with HxB2-p41A peptide or 89.6P-p41A peptide and then double stained with HxB2-p41A and 89.6P-p41A tetramers. Data presented are dot plots gated on CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes, with the percentages of gated cells in each quadrant indicated. PE, phycoerythrin; APC, allophycocyanin.

recognized HxB2-p41A also recognized 89.6P-p41A, while only a small subset of the HxB2-p41A-specific or the 89.6P-p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes recognized the clade C-p41A peptide. Therefore, the reactivity of CD8⁺ T cells from these monkeys did not broaden following infection.

To determine the particular TCR V β gene families that mediate the cross-recognition of the various forms of p41A, the p41A peptide-stimulated CD8⁺ T-lymphocyte populations were subjected to RNA extraction, cDNA synthesis, and V β analysis using rhesus monkey V β family-specific primer pairs (Fig. 3). In the setting of vaccination alone and following SHIV-89.6P challenge, p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from monkey AW13 that recognized 89.6P- and HxB2-p41A, but not clade C-p41A, made use of V β 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2, 13C.3, and 15, while those CD8⁺ T lymphocytes that recognized all three forms of p41A made use of V β 04 and 23. CD8⁺ T lymphocytes from monkey AW28 that recognized 89.6P- and HxB2-p41A, but not clade C-p41A, made use of V β 13C.2, while those CD8⁺ T lymphocytes that recognized all three forms of p41A made use of V β 7B and 12.3. CD8⁺ T lymphocytes that recognized 89.6P- and HxB2-p41A, but not clade C-p41A, from monkey AW2P made use of V β 9A, 9C, 13C1, 13C2, and 15, while those CD8⁺ T lymphocytes that recognized all three forms of p41A made use of V β 13A. We were therefore able to define the TCR V β gene families for each monkey that mediated the cross-recognition of the various forms of p41A.

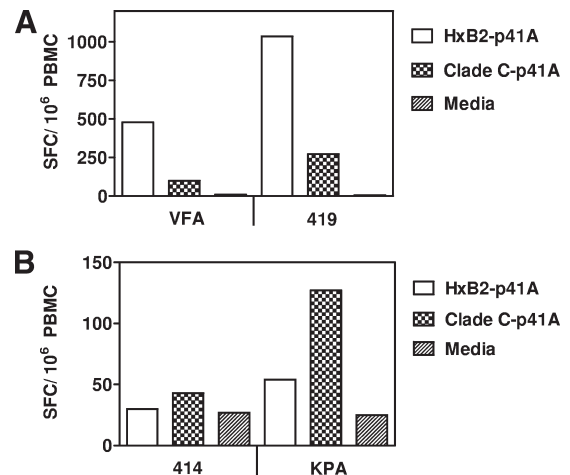


FIG. 5. p41A-specific IFN- γ ELISPOT responses of PBMC from Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys. (A) Responses observed for HxB2 Env-immunized monkeys (VFA and 419). (B) Responses observed for clade C Env-immunized monkeys (414 and KPA). PBMC were isolated from monkeys VFA, 419, KPA, and 414 at week 27 following vaccination (1-week post-rAd boost). Cells were stimulated in vitro in the presence of media alone or the noted p41A variant peptides, and IFN- γ SFC responses were measured. The mean numbers of spots per 10⁶ PBMC are shown.

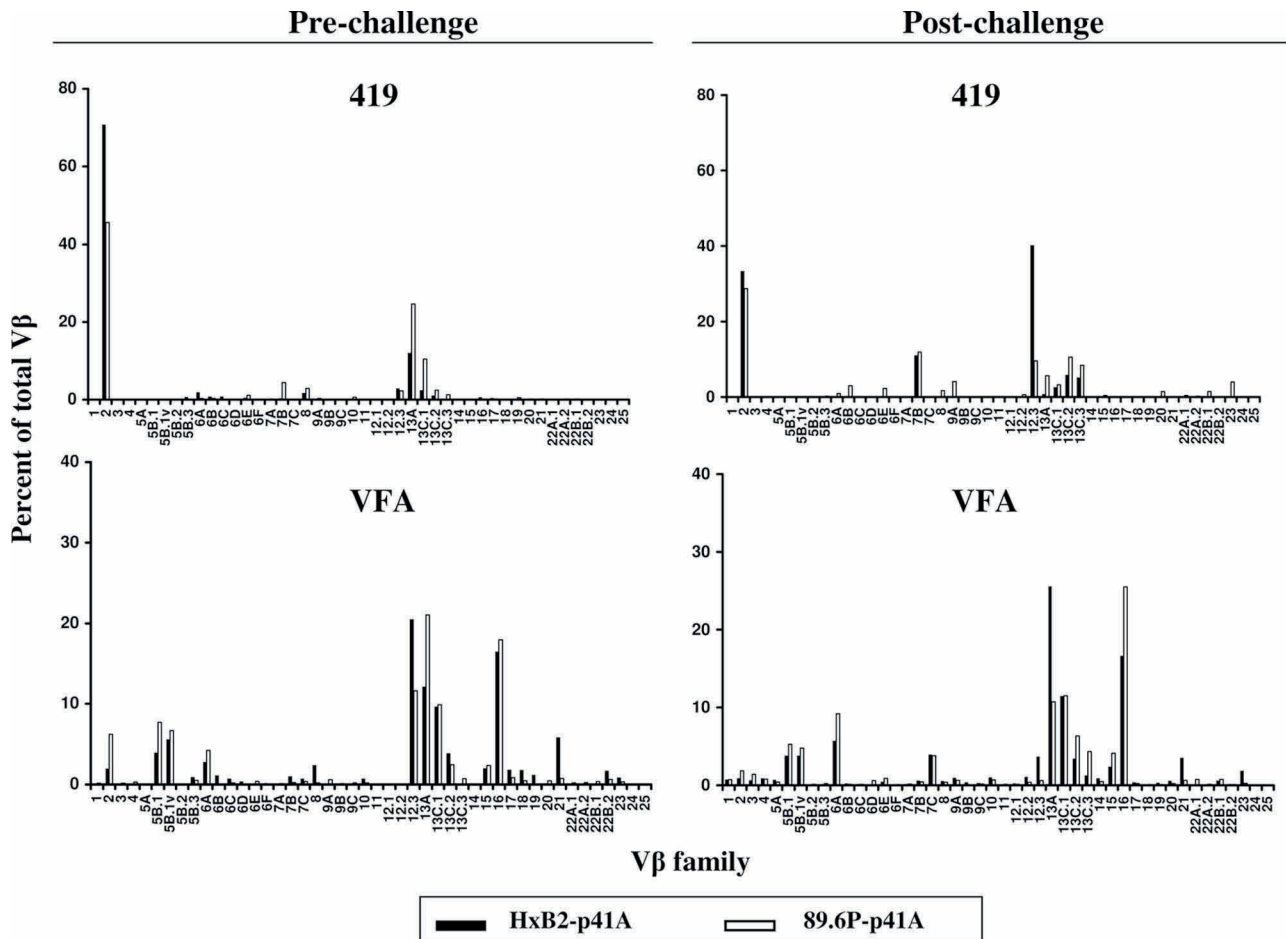


FIG. 6. V β repertoire analysis of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in HxB2 Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys following vaccination and challenge. PBMC were isolated from monkeys 419 and VFA at week 27 following vaccination or week 28 following SHIV-89.6P challenge. Cells were stimulated in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with HxB2-p41A peptide or 89.6P-p41A peptide. RNA isolated from sorted p41A-specific T cells (CD3⁺, CD8⁺, and tetramer positive) was used to generate cDNA for V β repertoire analysis by real-time PCR using a C β primer and 46 primers specific for V β gene families. Data are presented as the percentages of total V β gene families for each V β family.

Breadth of reactivity of p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from HxB2 Env-vaccinated and SHIV-89.6P-infected Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys. We sought to expand our experience using tetramers and V β repertoire analysis to characterize the breadth of CD8⁺ T-lymphocyte recognition of variant epitope peptides. To this end, two Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys (419 and VFA) were immunized with HxB2 Env, and peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes from these monkeys were assessed for reactivity with tetramers constructed with Mamu-A*01 and the two clade B p41A Env peptides, HxB2- and 89.6P-p41A (Fig. 4, four left panels). As in the previously described study (Fig. 1), most of the vaccine-induced CD8⁺ T-lymphocyte population that recognized the HxB2-p41A peptide in association with Mamu-A*01 also recognized the 89.6P-p41A peptide in association with Mamu-A*01. These tetramer binding studies were consistent with functional T-lymphocyte responses elicited by the peptides. PBMC from both monkeys generated IFN- γ spot-forming cell (SFC) responses after in vitro exposure to HxB2-p41A, with a smaller magnitude of cross-reactive responses to clade C-p41A (Fig. 5A). Following challenge with

SHIV-89.6P, most of the CD8⁺ T lymphocytes that bound the HxB2-p41A tetramer also bound the 89.6P-p41A tetramer (Fig. 4, four right panels). Thus, most of the CD8⁺ T lymphocytes that recognized one of these clade B p41A peptides also recognized the other clade B p41A peptide.

To determine the particular TCR V β gene families that mediate the cross-recognition of HxB2-p41A and 89.6P-p41A, the p41A peptide-stimulated CD8⁺ T-lymphocyte populations were subjected to V β analysis (Fig. 6). Following vaccination alone and following virus challenge, p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from monkey 419 that recognized 89.6P-p41A and HxB2-p41A made use of the same V β genes: 2, 7B, 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2, and 13C.3. Similarly, following vaccination alone and following virus challenge, p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from monkey VFA that recognized 89.6P-p41A and HxB2-p41A made use of the same V β genes: 2, 5B.1, 5B.1v, 6A, 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2, 13C.3, 15, 16, and 21. Therefore, consistent with the cross-reactivity of these CD8⁺ T-lymphocyte populations, as determined by tetramer binding, the same V β genes were employed to mediate recognition of these peptides.

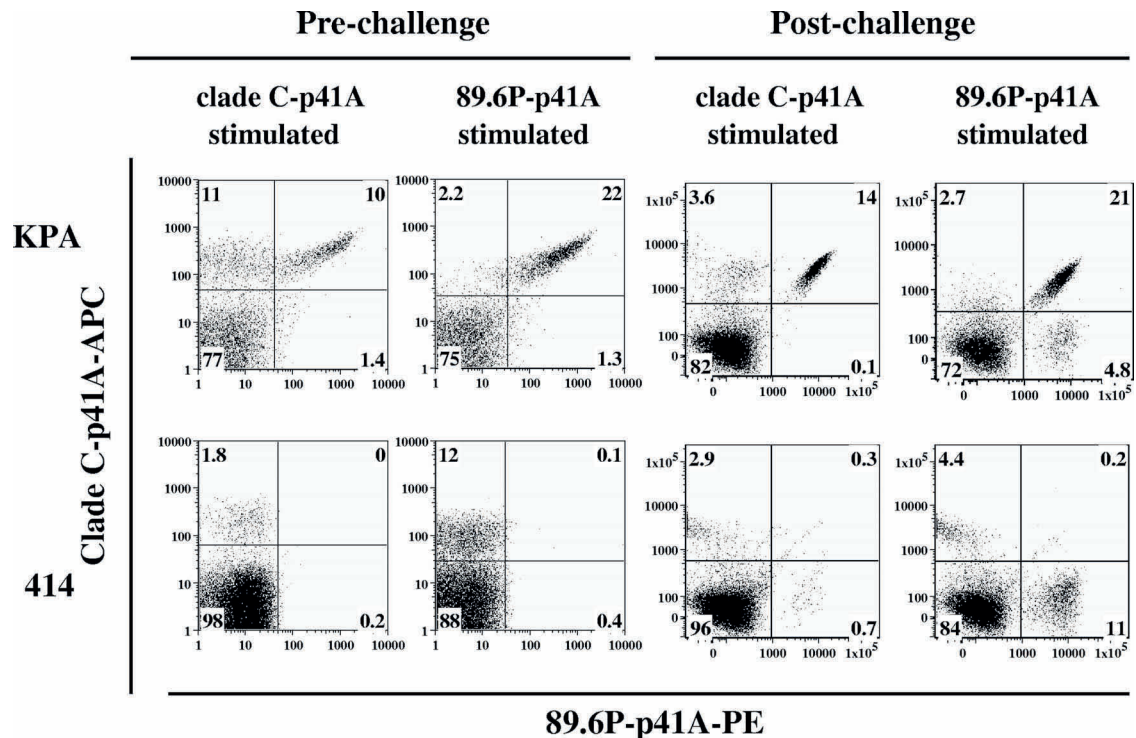


FIG. 7. Cross-reactivity of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in clade C Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys following vaccination and challenge. PBMC were isolated from monkeys KPA and 414 at week 27 following vaccination (1-week post-rAd boost) or week 20 following SHIV-89.6P challenge. Cells were stimulated in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with clade C-p41A peptide or 89.6P-p41A peptide and then double stained with clade C-p41A and 89.6P-p41A tetramers. Data presented are dot plots gated on CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes, with the percentages of gated cells in each quadrant indicated. PE, phycoerythrin; APC, allophycocyanin.

Breadth of reactivity of p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from clade C Env-vaccinated and SHIV-89.6P-infected Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys. We then used this same technical approach to characterize the recognition of clade B p41A epitope sequences by CD8⁺ T cells primed with a divergent clade C Env immunogen. Two Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys (KPA and 414) were immunized with clade C Env, and peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes from these monkeys were assessed for reactivity with tetramers constructed with Mamu-A*01 and clade C-p41A or 89.6P-p41A (Fig. 7, four left panels). In monkey KPA, approximately half of the vaccine-induced CD8⁺ T-lymphocyte population that recognized the clade C-p41A peptide in association with Mamu-A*01 also recognized the 89.6P-p41A peptide in association with Mamu-A*01. In monkey 414, none of the CD8⁺ T lymphocytes that recognized clade C-p41A recognized 89.6P-p41A. Therefore, while the restricting MHC class I allele for the p41A peptide was shared by monkeys KPA and 414 and the immunization regimen was identical for these two monkeys, the cross-reactivity for a variant epitope peptide differed in these vaccinated animals. Importantly, these divergent patterns of CD8⁺ T-lymphocyte binding to tetramers constructed with variant p41A peptides were consistent with the functional T-lymphocyte responses elicited by the peptides. PBMC from monkey KPA generated an IFN- γ SFC response after in vitro exposure to clade C-p41A and a lower response to HxB2-p41A. PBMC from monkey 414 generated an IFN- γ SFC response after in

vitro exposure to clade C-p41A but no response to HxB2-p41A (Fig. 5B).

Following challenge with SHIV-89.6P, changes were observed in the CD8⁺ T-lymphocyte populations that recognized p41A peptides in these two monkeys. As seen following vaccination alone, a fraction of the CD8⁺ T lymphocytes that bound the clade C-p41A tetramer also bound the 89.6P-p41A tetramer postchallenge in monkey KPA (Fig. 7, four right panels). However, in monkey 414, no CD8⁺ T-lymphocyte populations expanded that recognized both clade C-p41A and 89.6P-p41A. Importantly, in both of these monkeys, new CD8⁺ T-lymphocyte responses emerged following SHIV-89.6P challenge that had not been primed by prior vaccination—CD8⁺ T-lymphocyte populations that recognized 89.6P-p41A but not clade C-p41A (Fig. 7, four right panels).

The pattern of V β genes employed by these restricted populations of CD8⁺ T lymphocytes was, for the most part, consistent with these functional observations (Fig. 8). In monkey KPA, a population of CD8⁺ T lymphocytes employing V β 7B for p41A recognition mediated cross-recognition of clade C-p41A and 89.6P-p41A. However, a population of CD8⁺ T lymphocytes expressing V β 21 recognized clade C-p41A but not 89.6P-p41A in this monkey. Moreover, de novo-generated CD8⁺ T-lymphocyte populations were detected in this animal following SHIV-89.6P challenge, employing V β 13C.2, 13C.3, 15, and 16, that recognized 89.6P-p41A but not clade C-p41A. In monkey 414, vaccination generated populations

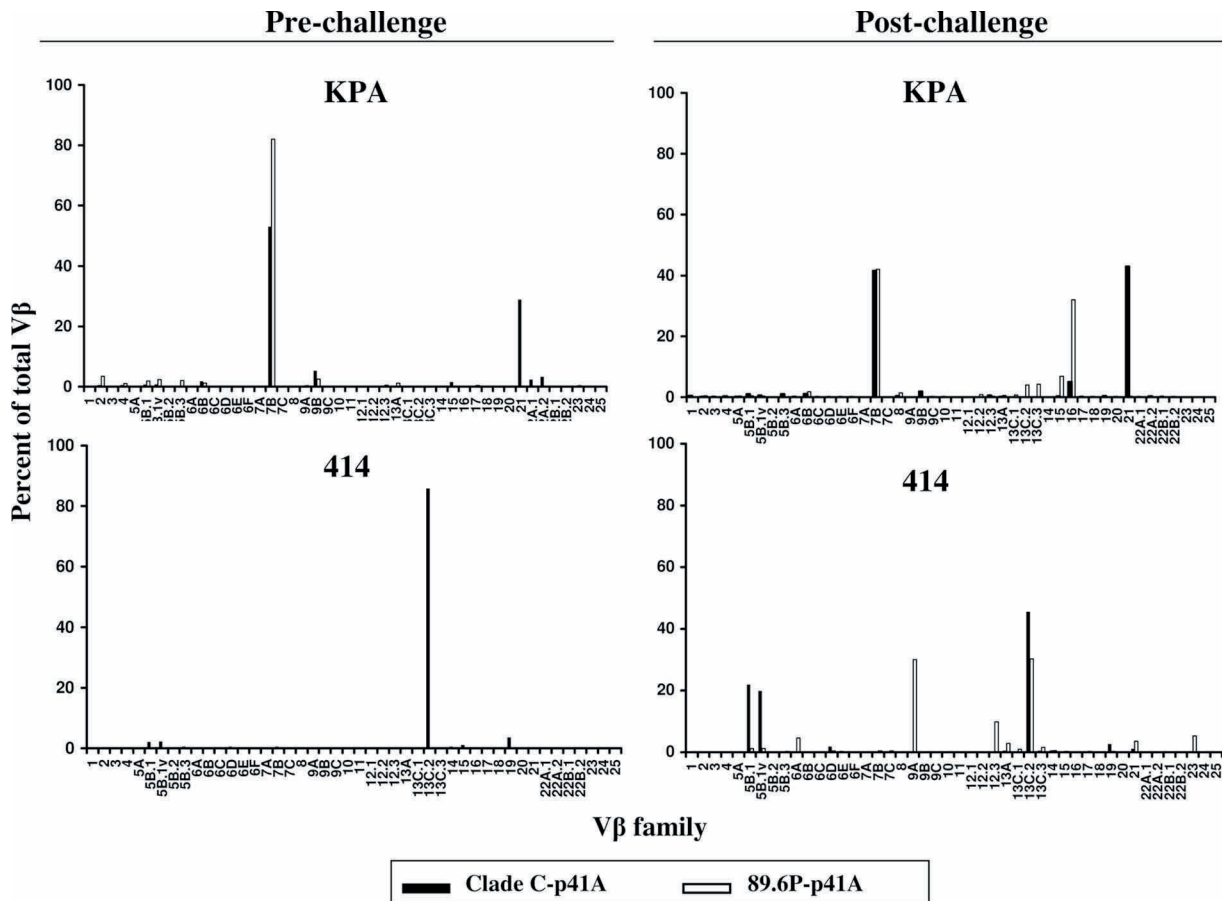


FIG. 8. V β repertoire analysis of p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in clade C Env-immunized Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys following vaccination and challenge. PBMC were isolated from monkeys KPA and 414 at week 27 following vaccination or week 20 following SHIV-89.6P challenge. Cells were stimulated *in vitro* for 12 to 14 days in the presence of IL-2 and clade C-p41A peptide or 89.6P-p41A peptide. RNA isolated from sorted p41A-specific T cells (CD3⁺, CD8⁺, and tetramer positive) was used to generate cDNA for V β repertoire analysis by real-time PCR using a C β primer and 46 primers specific for V β gene families. Data are presented as the percentages of total V β gene families for each V β gene family.

of clade C-p41-specific CD8⁺ T lymphocytes that predominantly employed V β 13C.2, with very small contributions from V β 5B.1, 5B.1v, and 19. None of these populations cross-reacted with the 89.6P-p41A peptide. Following SHIV-89.6P challenge, these same V β genes were represented in the repertoire, but additional genes were also employed by the p41A-reactive CD8⁺ T lymphocytes, including 9A, 12.3, and 13A. These three V β gene families were all employed for 89.6P-p41A recognition. Interestingly, the data on the use of V β 13C.2 suggested that some cross-reactivity should have been observed at the CD8⁺ T-lymphocyte level between clade C-p41A and 89.6P-p41A. However, such cross-reactivity was not detected by tetramer staining (Fig. 7).

To explore further the absence of reactivity of CD8⁺ T lymphocytes from monkey 414 for both clade C-p41A and 89.6P-p41A, we determined the precise clones employed for peptide epitope recognition through use of CDR3 sequencing (Table 2). As a control, PBMC from monkey KPA were stimulated *in vitro* with either the clade C-p41A or the 89.6P-p41A peptide, and the V β 7B and C β primers were used to generate the CDR3 sequence from each of the cell populations. Con-

sistent with the cross-reactivity of the CD8⁺ T lymphocytes for clade C-p41A and 89.6P-p41A, the same clonal population of CD8⁺ T lymphocytes mediated this cross-reactive recognition. Importantly, the sequencing of the V β 13C.2 cDNA from monkey 414 demonstrated that the clade C-p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes and the 89.6P-specific CD8⁺ T lymphocytes in fact represented different clonal populations of T lymphocytes, even though they employed the same V β family gene to mediate this recognition. Therefore, these sequencing data were consistent with the demonstration of a lack of cross-reactivity as determined by tetramer staining.

DISCUSSION

The experimental protocol employed in this study was configured to reflect the *in vivo* biology of a primed CD8⁺ T-lymphocyte population contacting viral antigen, with clonal constituents of that T-cell population then expanding in response to antigen recognition. The *in vitro* exposure of PBMC to epitope peptide is meant to reflect the *in vivo* exposure of PBMC to replicating virus. This exposure to peptide triggers the expansion of the subpopulation of primed CD8⁺ T lym-

TABLE 2. Analysis of CDR3 sequences in clade C-p41A and 89.6P-p41A epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys vaccinated with clade C Env and challenged with SHIV-89.6P^e

| Monkey | In vitro epitope peptide stimulation ^a | Vβ gene family | CDR3 sequence ^b | | | Jβ gene family | CDR3 length (no. of aa) ^c | Frequency ^d |
|--------|---|----------------|----------------------------|---------------|--------------|----------------|--------------------------------------|------------------------|
| | | | Vβ | Dβ | Jβ | | | |
| KPA | clade C-p41A | 7B | CASS | PNSGGV | AEAFF | 1.1 | 15 | 13/15 |
| | | | CVSS | PNSGGV | AEAFF | | 15 | 1/15 |
| | | | CASP | NSGGV | AEAFF | | 14 | 1/15 |
| | 89.6P-p41A | | CASS | PNSGGV | AEAFF | 1.1 | 15 | 9/11 |
| | | | CASS | HNSGGIT | EAFF | | 15 | 1/11 |
| | | | RASS | PNSGGV | AEAFF | | 15 | 1/11 |
| 414 | clade C-p41A 89.6P-p41A | 13C.2 | CAIK | RGEDD | EKLFF | 1.4 | 14 | 22/22 |
| | | | CASQ | FTGEK | KLFF | | 13 | 1/10 |
| | | | CASS | EYNRGS | YEQYF | | 2.7 | 15 |

^a PBMC were isolated from clade C Env-immunized monkeys KPA and 414 at week 20 following SHIV-89.6P challenge. Cells were cultured for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with either clade C-p41A or 89.6P-p41A peptides. RNA was isolated from sorted p41A-specific T cells (CD3⁺, CD8⁺, and tetramer positive) and used to generate cDNA for sequencing the CDR3.

^b Amino acid sequence of the CDR3 spanning the portion of VDJ-joining segments (relative to the Vβ, Dβ, and Jβ genes).

^c CDR3 lengths are expressed as the number of amino acids (aa) spanning the portion of VDJ-joining segments.

^d Number of clones with noted CDR3 sequence/total number of sequenced clones.

^e The most frequent CDR3 sequences are shown in boldface type.

phocytes that recognize that particular epitope peptide in association with MHC class I. Importantly, we have previously shown that such an in vitro peptide stimulation with the consequent expansion of a peptide/MHC class I-specific population of CD8⁺ T lymphocytes does not skew the TCR repertoire of the cell subpopulation being evaluated (20). Therefore, this experimental approach should yield biologically relevant data.

We chose to study the Mamu-A*01-restricted p41A epitope of HIV-1 Env as a representative epitope of a viral protein. It is an epitope that is predictably recognized by CD8⁺ T lymphocytes of Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys that are either vaccinated with HIV-1 Env or infected by a SHIV construct. Importantly, it is not an overwhelmingly dominant epitope like the Mamu-A*01-restricted Gag p11C or Tat TL8, nor is it an epitope like the Mamu-A*01-restricted Pol p68A that elicits sporadic, very low frequency CD8⁺ T-lymphocyte responses (1, 3, 8, 28, 32). Finally, since no subtypes of Mamu-A*01 have been defined in Indian-origin rhesus monkeys, we can be confident that divergent T-lymphocyte responses reflect TCR rather than MHC class I-determined cellular interactions. Therefore, we felt that an analysis of CD8⁺ T-lymphocyte responses to this epitope should provide an important window through which to view the biology of CD8⁺ T-lymphocyte recognition of variant epitope peptides.

Our intent in the present study was to marry a number of methodologies to determine precisely which clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes take part in the recognition of variant epitope peptides. Studying CD8⁺ T-lymphocyte binding to a series of tetramers constructed with the same MHC class I molecule and differing peptides provides a rapid assay for evaluating CD8⁺ T-lymphocyte recognition of variant Env sequences. To complement that data, we also employed a Vβ repertoire analysis to document which gene families are taking part in the peptide/MHC class I recognition. We felt that the use of a Vβ repertoire analysis provides data that complement the findings of Vβ gene CDR3 sequencing alone (2, 13, 33). When we wanted to clarify whether recognition of variant peptides mediated by CD8⁺ T lymphocytes expressing a single Vβ gene represented a single cross-reactive clone or multiple

clones that employed the same Vβ gene, we performed CDR3 sequencing. These methodologies, when used in combination, provide a comprehensive definition of which CD8⁺ T-lymphocyte clones recognize a series of mutant forms of an epitope and which recognize a restricted population of potential epitopes.

Although the number of monkeys that we studied was small, the application of these methodologies for evaluating CD8⁺ T-lymphocyte populations in vaccinated and infected rhesus monkeys yielded findings that are troubling with regard to harnessing the immune system for the control of HIV-1. We found in a pair of rhesus monkeys with a shared MHC class I molecule that restricts p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes that one of these animals could generate a population of cross-reactive p41-specific CD8⁺ T lymphocytes and the other could not. This divergence in responses was seen following vaccination and following infection. We were able to demonstrate that these differences reflect the use of distinct clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes that mediate p41A recognition. Thus, one of these monkeys had a vaccine-elicited population of CD8⁺ T lymphocytes that could recognize a divergent infecting virus while the other monkey did not. This observation underscores the challenges that we face as we attempt to harness the immune response to control the spread of HIV-1.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Michelle Lifton for excellent technical assistance with flow cytometry, and we thank Lauren Dorosh for help with flow cytometry analysis.

This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (grant AI067854 to N.L.L.).

REFERENCES

- Allen, T. M., D. H. O'Connor, P. Jing, J. L. Dzuris, B. R. Mothe, T. U. Vogel, E. Dunphy, M. E. Liebl, C. Emerson, N. Wilson, K. J. Kunstman, X. Wang, D. B. Allison, A. L. Hughes, R. C. Desrosiers, J. D. Altman, S. M. Wolinsky, A. Sette, and D. I. Watkins. 2000. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* **407**: 386-390.
- Appay, V., D. C. Douek, and D. A. Price. 2008. CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat. Med.* **14**:623-628.

3. Barouch, D. H., A. Craiu, S. Santra, M. A. Egan, J. E. Schmitz, M. J. Kuroda, T. M. Fu, J. H. Nam, L. S. Wyatt, M. A. Lifton, G. R. Krivulka, C. E. Nickerson, C. I. Lord, B. Moss, M. G. Lewis, V. M. Hirsch, J. W. Shiver, and N. L. Letvin. 2001. Elicitation of high-frequency cytotoxic T-lymphocyte responses against both dominant and subdominant simian-human immunodeficiency virus epitopes by DNA vaccination of rhesus monkeys. *J. Virol.* **75**:2462–2467.
4. Barouch, D. H., J. Powers, D. M. Truitt, M. G. Kishko, J. C. Arthur, F. W. Peyerl, M. J. Kuroda, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, C. I. Lord, V. M. Hirsch, D. C. Montefiori, A. Carville, K. G. Mansfield, K. J. Kunstman, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin. 2005. Dynamic immune responses maintain cytotoxic T lymphocyte epitope mutations in transmitted simian immunodeficiency virus variants. *Nat. Immunol.* **6**:247–252.
5. Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. Oldstone. 1994. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**:6103–6110.
6. Buonaguro, L., M. L. Tornesello, and F. M. Buonaguro. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol.* **81**:10209–10219.
7. Dykes, C., and L. M. Demeter. 2007. Clinical significance of human immunodeficiency virus type 1 replication fitness. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:550–578.
8. Egan, M. A., M. J. Kuroda, G. Voss, J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. I. Lord, M. A. Forman, and N. L. Letvin. 1999. Use of major histocompatibility complex class I/peptide/β2M tetramers to quantitate CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes specific for dominant and nondominant viral epitopes in simian-human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Virol.* **73**:5466–5472.
9. Frahm, N., P. Kiepiela, S. Adams, C. H. Linde, H. S. Hewitt, K. Sango, M. E. Feeny, M. M. Addo, M. Lichterfeld, M. P. Lahaie, E. Pae, A. G. Wurcel, T. Roach, M. A. St. John, M. Altfeld, F. M. Marincola, C. Moore, S. Mallal, M. Carrington, D. Heckerman, T. M. Allen, J. I. Mullins, B. T. Korber, P. J. Goulder, B. D. Walker, and C. Brander. 2006. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* **7**:173–178.
10. Friedrich, T. C., C. A. Frye, L. J. Yant, D. H. O'Connor, N. A. Kriewaldt, M. Benson, L. Vojnov, E. J. Dodds, C. Cullen, R. Rudersdorf, A. L. Hughes, N. Wilson, and D. I. Watkins. 2004. Extraepitopic compensatory substitutions partially restore fitness to simian immunodeficiency virus variants that escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response. *J. Virol.* **78**:2581–2585.
11. Fu, T. M., S. A. Dubey, D. V. Mehrotra, D. C. Freed, W. L. Trigona, L. Adams-Muhler, J. H. Clair, T. G. Evans, R. Steigbigel, J. M. Jacobson, P. A. Goepfert, M. J. Mulligan, S. A. Kalam, C. Rinaldo, L. Zhu, K. S. Cox, L. Guan, R. Long, N. Persaud, M. J. Caulfield, J. C. Sadoff, E. A. Emini, S. Thaler, and J. W. Shiver. 2007. Evaluation of cellular immune responses in subjects chronically infected with HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **23**:67–76.
12. Goulder, P. J., R. E. Phillips, R. A. Colbert, S. McAdam, G. Ogg, M. A. Nowak, P. Giangrande, G. Luzzi, B. Morgan, A. Edwards, A. J. McMichael, and S. Rowland-Jones. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* **3**:212–217.
13. Greenaway, H. Y., M. Kurniawan, D. A. Price, D. C. Douek, M. P. Davenport, and V. Venturi. 2009. Extraction and characterization of the rhesus macaque T-cell receptor beta-chain genes. *Immunol. Cell Biol.* doi:10.1038/icb.2009.38.
14. Knapp, L. A., E. Lehmann, M. S. Piekarczyk, J. A. Urvater, and D. I. Watkins. 1997. A high frequency of Mamu-A*01 in the rhesus macaque detected by polymerase chain reaction with sequence-specific primers and direct sequencing. *Tissue Antigens* **50**:657–661.
15. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**:4650–4655.
16. Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, D. H. Barouch, A. Craiu, T. M. Allen, A. Sette, D. I. Watkins, M. A. Forman, and N. L. Letvin. 1998. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J. Exp. Med.* **187**:1373–1381.
17. Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. E. Nickerson, M. A. Lifton, C. I. Lord, M. A. Forman, and N. L. Letvin. 1999. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J. Immunol.* **162**:5127–5133.
18. Letvin, N. L., Y. Huang, B. K. Chakrabarti, L. Xu, M. S. Seaman, K. Beaudry, B. Koriath-Schmitz, F. Yu, D. Rohne, K. L. Martin, A. Miura, W. P. Kong, Z. Y. Yang, R. S. Gelman, O. G. Golubeva, D. C. Montefiori, J. R. Mascola, and G. J. Nabel. 2004. Heterologous envelope immunogens contribute to AIDS vaccine protection in rhesus monkeys. *J. Virol.* **78**:7490–7497.
19. Malim, M. H., and M. Emerman. 2001. HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* **104**:469–472.
20. Manuel, E. R., W. A. Charini, P. Sen, F. W. Peyerl, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, P. Autissier, D. A. Sheeter, B. E. Torbett, and N. L. Letvin. 2006. Contribution of T-cell receptor repertoire breadth to the dominance of epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. *J. Virol.* **80**:12032–12040.
21. McMichael, A. J., and S. L. Rowland-Jones. 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature* **410**:980–987.
22. McMichael, A., M. Mwau, and T. Hanke. 2002. Design and tests of an HIV vaccine. *Br. Med. Bull.* **62**:87–98.
23. Musey, L., J. Hughes, T. Schacker, T. Shea, L. Corey, and M. J. McElrath. 1997. Cytotoxic T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **337**:1267–1274.
- 23a. National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, DC.
24. Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F. Nixon, and A. J. McMichael. 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**:2103–2106.
25. Price, D. A., P. J. Goulder, P. Klenerman, A. K. Sewell, P. J. Easterbrook, M. Troop, C. R. Bangham, and R. E. Phillips. 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1890–1895.
26. Raaphorst, F. M., R. L. Schelonka, J. Rusnak, A. J. Infante, and J. M. Teale. 2002. TCRBV CDR3 diversity of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in HIV-1-infected individuals. *Hum. Immunol.* **63**:51–60.
27. Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171–1173.
28. Santra, S., D. H. Barouch, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, G. R. Krivulka, K. Beaudry, C. I. Lord, M. A. Lifton, L. S. Wyatt, B. Moss, V. M. Hirsch, and N. L. Letvin. 2002. Prior vaccination increases the epitopic breadth of the cytotoxic T-lymphocyte response that evolves in rhesus monkeys following a simian-human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **76**:6376–6381.
29. Santra, S., M. S. Seaman, L. Xu, D. H. Barouch, C. I. Lord, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, K. R. Beaudry, K. Svehla, B. Welcher, B. K. Chakrabarti, Y. Huang, Z. Y. Yang, J. R. Mascola, G. J. Nabel, and N. L. Letvin. 2005. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J. Virol.* **79**:6516–6522.
30. Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghreyeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* **283**:857–860.
31. Seaman, M. S., L. Xu, K. Beaudry, K. L. Martin, M. H. Beddall, A. Miura, A. Sambor, B. K. Chakrabarti, Y. Huang, R. Bailer, R. A. Koup, J. R. Mascola, G. J. Nabel, and N. L. Letvin. 2005. Multiclaude human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *J. Virol.* **79**:2956–2963.
32. Sen, P., W. A. Charini, R. A. Subbramanian, E. R. Manuel, M. J. Kuroda, P. A. Autissier, and N. L. Letvin. 2008. Clonal focusing of epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes in rhesus monkeys following vaccination and simian-human immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* **82**:805–816.
33. Smith, M. Z., T. E. Asher, V. Venturi, M. P. Davenport, D. C. Douek, D. A. Price, and S. J. Kent. 2008. Limited maintenance of vaccine-induced simian immunodeficiency virus-specific CD8 T-cell receptor clonotypes after virus challenge. *J. Virol.* **82**:7357–7368.
34. Temin, H. M. 1993. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6900–6903.

Article 2

Sandrine L. Hulot, Evan M. Cale, Bette T. Korber, Norman L. Letvin.

Vaccine-induced CD8⁺ T lymphocytes of rhesus monkeys recognize variant forms of a viral epitope but do not mediate optimal functional activity after binding to the variant epitope peptides.

soumis au journal *Nature Immunology*

RESUME

La diversité génétique du VIH-1 représente un challenge dans le développement d'un vaccin qui doit conférer une protection contre les différentes formes du virus pour être efficace. Cette étude a été initiée pour explorer la diversité de variants peptidiques d'un épitope de l'enveloppe reconnu par des populations de lymphocytes T CD8⁺ élicités par la vaccination de singes rhésus Mamu-A*01+. En utilisant des tétramères spécifiques de ces variants qui présentent la même capacité à se lier au CMH-I, nous avons montré que des populations de lymphocytes T CD8⁺ générés par la vaccination peuvent reconnaître l'épitope relatif à l'immunogène et un certain nombre de variants peptidiques de cet épitope. Bien que les tests basés sur le marquage des populations de lymphocytes T CD8⁺ avec des tétramères démontrent la capacité de ces populations clonales de lymphocytes à reconnaître diverses variants d'un épitope, les tests fonctionnels montrent que ces variants stimulent une production suboptimale de cytokines par ces lymphocytes T CD8⁺. Ces travaux suggèrent donc que des populations de lymphocytes T CD8⁺ générés par la vaccination peuvent reconnaître diverses formes d'un épitope viral, mais ne fonctionneraient pas de manière optimale pour conférer une protection contre des virus exprimant ces diverses séquences.

Mots clés: VIH-1, vaccin, lymphocytes T CD8⁺, V β répertoire, CDR3

ABSTRACT

The sequence diversity of HIV-1 presents a challenge for the development of an effective HIV-1 vaccine, since such a vaccine must confer protection against diverse forms of the virus. The present studies were initiated to explore how vaccine-induced clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes of rhesus monkeys recognize variants of an HIV-1 envelope epitope sequence. Evaluating variants of a selected epitope peptide that retain their binding to the MHC class I molecule of rhesus monkeys that presents this epitope peptide, we show that vaccine-elicited CD8⁺ T lymphocytes comparably recognize the wild-type and a number of variant epitope peptides as determined by tetramer binding assays. In fact, the same clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes recognize the wild-type and variant epitope peptides. However, functional assays show that many of these variant epitope peptides stimulate suboptimal cytokine production by the vaccine-elicited CD8⁺ T lymphocytes. These findings suggest that vaccine-induced CD8⁺ T lymphocyte populations may recognize diverse forms of a viral epitope, but may not function optimally to confer protection against viruses expressing many of those variant sequences.

Keywords : HIV-1, Env vaccine, CD8⁺ T lymphocytes, V β repertoire, CDR3

INTRODUCTION

A defining characteristic of HIV-1 is its extraordinary sequence diversity. This variability is manifested in dramatic sequence differences in transmitted viral variants^{32,33,238-241}. The virus also undergoes continuous sequence evolution in an infected individual as it mutates to escape from immune pressure^{88-90,242-247}. This sequence variability presents a daunting challenge for the creation of an HIV-1 vaccine, since a vaccine that is effective worldwide must confer protection against very divergent forms of the virus^{31,248-251}.

We actually know very little about the diversity of HIV-1 variants that can be recognized by CD8+ T lymphocytes generated using traditional vaccine strategies. Vaccine-induced CD8+ T lymphocyte populations have usually been monitored to document the magnitude and durability of the response^{140,161,189,252,253}. These cells have also been assessed for their functional profiles, including the repertoire of cytokines they produce, their level of maturation, and the effector molecules that they release^{154,162,194,205,208,215-217,254}. Importantly, very little has been done to elucidate the diversity of HIV-1 variants that can be recognized by vaccine-induced CD8+ T lymphocyte populations.

The rhesus monkey/simian human immunodeficiency virus (SHIV) model for AIDS provides a powerful system for exploring immune recognition of vaccine-elicited CD8+ T lymphocytes. SHIVs are usually constructed with an HIV-1 envelope

expressed on a simian immunodeficiency virus (SIV) backbone¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. We have shown that a predictable epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte population is generated to the p41A epitope of HIV-1 envelope in both vaccinated and SHIV-infected rhesus monkeys that express the MHC class I molecule Mamu-A*01^{132,237}.

In the present study, we have used the rhesus monkey/SHIV model to explore the breadth of recognition by vaccine-elicited CD8⁺ T lymphocytes of variants of an HIV-1 envelope epitope. Evaluating 9 variants of the p41A epitope peptide that retain their binding to the Mamu-A*01 molecule, we have assessed the diversity of variants that are recognized by vaccine-elicited CD8⁺ T lymphocytes, the clonality of the CD8⁺ T lymphocytes, and the functional activity of these vaccine-elicited cells following recognition of the variant epitope peptides. We show that vaccine-generated CD8⁺ T lymphocytes recognize a diversity of variant forms of the p41A epitope, but these variant epitope peptides vary in their ability to stimulate functional responses by these cells.

MATERIALS AND METHODS

Immunizations and challenge of rhesus monkeys

The 6 adult Indian-origin rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) used in this study were maintained in a facility accredited by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee for Harvard Medical School and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*²²⁰. These monkeys expressed the major histocompatibility complex class I allele *Mamu-A*01*. Two monkeys were unvaccinated. The 4 monkeys were immunized with plasmid DNA or with Ad5 vectors expressing Gag/Pol and HIV-1 89.6P Env¹³². All monkeys were challenged intravenously with 1×10^8 RNA copies of the simian-human immunodeficiency virus KB9 clone of SHIV-89.6P.

Peptide binding assays

Peptide binding to Mamu-A*01 was assessed by measuring the inhibition of the iodinated HxB2-p41A analogue peptide (YAPPISGQI) binding in competition with 22 variants of p41A epitope peptides that represented diverse HIV-1 envelopes (listed in Table I). We used transformed 721.221 cells that express the MHC class I molecule Mamu-A*01 and purified it using immunoaffinity purification by a column chromatography method. Briefly, the HxB2-p41A analogue peptide was iodinated and incubated for 48 hours with serial dilutions of unlabeled variants of the p41A peptide, β_2 -microglobulin, the purified MHC class I molecule Mamu-A*01, and a protease

inhibitor cocktail. The samples were transferred onto a Wallace High Binding isoplate (cat # 1450-518) coated with the monoclonal antibody MHC-I W6/32 (strategic biosolutions) and incubated for 3 hours at temperature room in the dark. The unbound peptide/MHC/ β_2m complexes were removed by washing, and radioactivity was measured with an optipex GX400 scintillation counter.

Antibodies, tetramers, and peptides

The antibodies used in this study were directly coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) or PerCP Cy5.5. The following mAbs were used: FITC-conjugated anti-CD8 $\alpha\beta$ (clone SK1; BD PharMingen) and PerCP Cy5.5 -conjugated anti-CD3 (clone SP34.2; BD PharMingen). We constructed tetramer complexes specific for 9 variants of p41A epitope peptides shown in Figure 1C. Each tetramer was prepared as previously described^{142,156,158,229}. Briefly, streptavidin R-phycoerythrin or streptavidin-allophycocyanin (phycilink, Prozyme) was mixed stepwise with biotinylated Mamu-A*01/peptide/ β_2m complexes at a molar ratio of 1:4 to produce the tetrameric complexes. All lyophilized peptides obtained from New England peptide LLC were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich) and diluted to a stock peptide concentration of 10 mg/ml in water, then frozen at -80°C in aliquots. Before use, peptides were diluted to a working concentration in RPMI 1640 medium (Mediatech) supplemented with glutamine, 12% Fetal Calf serum, streptomycin, and gentamycin.

Flow cytometry

PBMC were isolated from unvaccinated monkeys between both day 290 and 314 after infection with SHIV-KB9, and from immunized monkeys 290 weeks following immunization and 20 weeks following SHIV-KB9 challenge. Cells were separated over Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech) and cryopreserved. Thawed PBMC cultured in the presence of interleukin-2 (IL-2) were stimulated with 1µg/ml of each variant of p41A epitope peptide listed in Figure 1C, harvested on days 12-14, and separated using a pre-separation filter (Miltenyi Biotec). The cells were stained with each tetramer specific for the variant p41A epitope peptide used to stimulate PBMC or with a combination of those tetramers, for 15 min at room temperature. Then, cells were stained with a mixture of anti-CD3 and anti-CD8 mAbs for 15 min. Samples were analysed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Each CD3⁺CD8⁺ variant p41A epitope-specific T lymphocyte population was sorted to a purity of 98%.

Generation of cDNA

RNA was extracted from each Mamu-A*01/variant p41A/ β2m tetramer-binding CD8⁺ CD3⁺ T lymphocyte population according to the instructions supplied with the RNeasy Mini Extraction kit from Qiagen (Valencia, CA). cDNA was then synthesized from the extracted RNA as described in the Super SMART PCR cDNA Synthesis kit from clontech Laboratories (Palo Alto, CA). Briefly, the single-stranded cDNA reaction was catalyzed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase with the 3'SMART CDS Primer IIA and Smart IIA Oligonucleotide primers provided in the Super SMART cDNAs synthesis kit. Pre-amplified double-stranded cDNA libraries

were made using 10-25 cycle PCR amplification, utilizing the 5'PCR primer IIA and reagents provided in the Clontech kit. The optimal number of cycles of preamplification was determined by performing a test run in the presence of SYBR Green to determine the maximum number of PCR cycles that could be performed in the log-linear amplification range¹⁸³.

Primers and Real time PCR

Primers used for the real-time PCR assay and for sequencing (Sen et al., Table D)¹⁸⁹ were ordered from Biosource International. They were manufactured by Keystone Labs (Camarillo, CA) and purified by high-performance liquid chromatography. The real-time TaqMan probes were synthesized at Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA) and were purified by HPLC. Primers specific for the variable and constant region of the TCR β chain were designed from rhesus monkey TCR sequences obtained from GenBank.

Quantitative PCR

cDNA derived from each sample was equally distributed into 48 individual PCR reactions. Each reaction contained a sense V β family-specific primer, an anti-sense C β -specific primer, and the TaqMan C β probe. PCR reactions were carried out using Sure-Strat Taq (Stratagene). The real time PCR was carried out on an MX4000 QPCR machine (Stratagene) under the following conditions: 95°C for 10 min; 50 cycles: 95°C for 10 sec, 58°C for 30 sec, read fluorescence, 72°C for 30 sec. Background values for this V β quantitative PCR assay were on average 0.7 % of the total copies in a series of

reactions. Thus, we chose 0.7% as the threshold for considering a particular V β gene family as contributing to the effective V β repertoire of an epitope-specific CD8⁺ T cell response.

Sequencing

The TCR β complementarity-determining region 3 (CDR3) of a V β gene family expressed by more than two different CD3⁺CD8⁺ variant-p41A tetramer⁺ sorted T cells was sequenced (Post-vaccination). Also, the TCR β CDR 3 of the major V β gene families still expressed by those epitope-specific T cells post-challenge were sequenced. cDNA generated for use in the quantitative PCR assays was used as template for a second round of PCR reactions utilizing V β 4, 7B, 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2 or 23 primers and a C β primer (Biosource International Inc.). The cDNA was amplified in a Perkin Elmer 9600 GeneAmp PCR system under the following conditions: 95°C for 10 min; 35 cycles: 95°C for 10 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 30 sec. PCR products were purified using the MiniElute Reaction cleanup kit (Qiagen) following the instructions of the manufacturer, cloned using the pGEM T-easy system (Promega), and sequenced using a T7/SP6 primers.

PBMC stimulation and intracellular staining

PBMC were separated from EDTA anti-coagulated blood over a Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech) and cryopreserved. Cells were later thawed and allowed to rest for 1h at 37°C in a 5% CO₂ environment. Two million lymphocytes were incubated for 6h with medium only and medium with costimulators CD28/CD49d as negative controls, with PMA/ionomycin as positive control, or stimulated with

variants of the p41A (env) epitope peptides. All cultures contained protein transport inhibitors (Brefeldin A/Monensin, Golgi Plug/Stop BD Bioscience), as well as 1 µg of anti-CD28/ml and 1 µg of anti-CD49d/ml (BD Bioscience). The cultured cells were then stained with a cell viability marker (aqua dead cell stain kit, Invitrogen), pretitered quantities of CD4 PerCP-Cy5-5 (L200, BD Bioscience) and CD8 APC-Cy7 (SK1, BD Bioscience) specific MAbs and tetramers specific for variants of p41A. After being fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Bioscience), cells were stained with antibodies specific for CD3-Pacific Blue (SP34.2, BD Biosciences), CD69-ECD (TP1.55.3, Beckman Coulter), gamma interferon IFN- γ PE-Cy7 (B27, BD Biosciences), tumor necrosis factor alpha TNF- α FITC (MAb11, BD Biosciences) and interleukin-2 IL-2 APC (MQ1-17H12, BD Biosciences), and fixed with 2% formaldehyde. Samples were collected on a LSR II instrument (BD Biosciences) and analyzed by using FlowJo software (version 8.8.6). Approximately 10^6 events were collected per sample. The background level of cytokine staining varied from sample to sample, but was typically below 0.02% of gated CD8⁺ T cells. All values used for analysis were background subtracted.

RESULTS

Selection of p41A variant peptides for evaluation

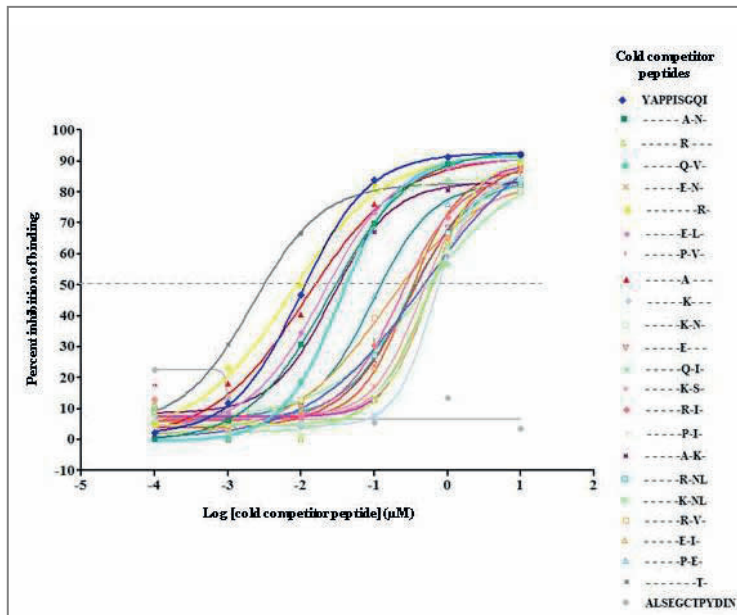
We were interested in exploring CD8⁺ T lymphocyte recognition of variant sequences of an HIV-1 epitope in the rhesus monkey as a model for assessing the ability of the cellular immune response to recognize emerging mutant HIV-1 isolates. We selected the well characterized p41A (YAPPISGQI) HIV-1 Env epitope presented by the Mamu-A*01 MHC class I molecule in simian-human immunodeficiency virus (SHIV)-infected or vaccinated Indian-origin rhesus monkeys as a model epitope for these studies^{132,142,148,173,189}. Screening 200 naturally occurring variants of this epitope in HIV-1 envelope sequences catalogued in the Los Alamos data base, we selected the prototype HxB2 and the 2 most frequent variants in each of 11 clades of the group M viruses for further analysis (Table 1). These variants differed from the prototype HxB2 p41 sequence by 1, 2, or 3 amino acids. Since variant p41A epitope sequences could only be recognized in the rhesus monkey if they bind to the MHC class I molecule that presents the p41A peptide to immune cells, we evaluated the relative binding efficiency of these 22 variant p41A peptides for the Mamu-A*01 molecule (Fig. 1A, B). Using a cell-free peptide binding assay, the 23 variant peptides were incubated at increasing concentrations with a fixed amount of the iodinated indicator peptide, I¹²⁵-HxB2 p41, and assessed for cold peptide inhibition of indicator peptide binding to Mamu-A*01. The IC₅₀ of each variant epitope peptide was determined by non-linear curve fitting to a dose-response model. Two discrete clusters of peptides were distinguishable on the basis of the IC₅₀ values: one group with a lower IC₅₀ and a tight 95% confidence interval and one group with a higher IC₅₀ and a large 95% confidence interval. We selected the peptides with the lower IC₅₀ values (boxed in

Fig. 1B) for further evaluation. These peptides represented the diversity of variants that have been documented in divergent clades of HIV-1 (Fig. 1C).

| Variants of p41A sequence | | Frequency (%) |
|---------------------------|-----------|---------------|
| HxB2-p41A | YAPPISGQI | 2.9 |
| variant 1 | -----A-N- | 12.2 |
| variant 2 | -----R--- | 8.5 |
| variant 3 | -----Q-V- | 5.4 |
| variant 4 | -----E-N- | 5.4 |
| variant 5 | -----R- | 3.1 |
| variant 6 | -----E-L- | 2.5 |
| variant 7 | -----P-V- | 2.2 |
| variant 8 | -----A--- | 2 |
| variant 9 | -----K--- | 1.8 |
| variant 10 | -----K-N- | 1.7 |
| variant 11 | -----E--- | 1.6 |
| variant 12 | -----Q-I- | 1.5 |
| variant 13 | -----K-S- | 1.2 |
| variant 14 | -----R-I- | 1.2 |
| variant 15 | -----P-I- | 1.2 |
| variant 16 | -----A-K- | 1.1 |
| variant 17 | -----R-NL | 1.1 |
| variant 18 | -----K-NL | 1.1 |
| variant 19 | -----R-V- | 1.1 |
| variant 20 | -----E-I- | 1.1 |
| variant 21 | -----P-E- | 0.7 |
| variant 22 | -----T- | 0.6 |

Table I: Naturally occurring variants of the HIV-1 Env p41A epitope peptides tested for their affinity for the rhesus monkey MHC class I molecule Mamu-A*01. 978 sequences (88 subtypes) yielded 200 variants of the HIV-1 envelope p41A epitope (YAPPISGQI, HxB2 location: gp160 435-443, Los Alamos Data Base). The two most frequent variants in each of the eleven clades of HIV-1 (group M) were selected to evaluate their capacity to bind to the rhesus monkey MHC class I molecule Mamu-A*01.

A.



B.

| Variants of p41A | IC ₅₀ (nM) | 95% Confidence Intervals |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| YAPPISGQI (Y19) | 9.89 | { 7.88 to 12.41 } |
| ----- T - | 2.17 | { 1.04 to 4.55 } |
| ----- R - | 7.04 | { 1.78 to 27.86 } |
| ---- A --- | 11.70 | { 2.80 to 48.91 } |
| ---- E - L - | 19.78 | { 16.46 to 23.76 } |
| ---- A - N - | 23.95 | { 20.91 to 27.43 } |
| ---- A - K - | 26.18 | { 1.48 to 463.2 } |
| ---- Q - I - | 30.58 | { 11.16 to 83.78 } |
| ---- Q - V - | 34.72 | { 28.68 to 42.04 } |
| ---- P - E - | 96.11 | { 55.75 to 165.7 } |
| ---- R - V - | 143.3 | { 26.65 to 770.1 } |
| ---- R - I - | 221.1 | { 31.43 to 1556 } |
| ---- R - NL | 287.5 | { 121.8 to 678.4 } |
| ---- E - I - | 299.7 | { 56.29 to 1595 } |
| ---- E --- | 326.6 | { 121.3 to 879.2 } |
| ---- K - S - | 421.5 | { 130.2 to 1365 } |
| ---- K - NL | 471.3 | { 30.53 to 7275 } |
| ---- P - V - | 478.3 | { 60.48 to 3782 } |
| ---- P - I - | 493.1 | { 47.45 to 5125 } |
| ---- K - N - | 504.1 | { 286.1 to 888.3 } |
| ---- R --- | 563.3 | { 208.6 to 1522 } |
| ---- E - N - | 573.7 | { 245 to 1343 } |
| ---- K --- | 643.5 | { 407 to 1018 } |

C.

| HIV-1 Envelope | p41A epitope sequence | subtypes |
|----------------|-----------------------|----------------|
| HxB2 | YAPPISGQI | B |
| 89.6P | YAPPIAGQI | B |
| Variant 1 | YAPPIAGNI | C, G, J |
| Variant 3 | YAPPIQGVVI | A, O2_AG |
| Variant 5 | YAPPISGRI | O1_AE |
| Variant 6 | YAPPIGLI | D |
| Variant 8 | YAPPIAGQI | D |
| Variant 12 | YAPPI G I | A, B, C, O2_AG |
| Variant 16 | YAPPIAGKI | F ₁ |

Figure 1. Relative binding inhibition of ¹²⁵I-p41A to the rhesus monkey MHC class I molecule *Mamu-A*01* by HxB2-p41A and variant p41A peptides. A. A cell free peptide binding assay was used to determine the inhibition of the binding to *Mamu-A*01* of a radiolabeled indicator peptide (HxB2-p41A) by various concentrations of unlabeled variants of p41A (listed in Table I) or an irrelevant control peptide. Values were determined by a non-linear curve fitting to a dose response model using the software program Prism. IC₅₀ is the concentration of cold peptide required to inhibit 50% of radiolabeled indicator peptide binding (dashed line). B. Peptides with the lowest IC₅₀ values (boxed) were chosen to make tetramers. C. The listed variant p41A epitope peptides are representative of the 11 clades of HIV-1.

Reactivity with variant epitope peptides of p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from SHIV-KB9-infected *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys

We then assessed the ability of CD8⁺ T lymphocytes from rhesus monkeys infected with a SHIV isolate to recognize these variant epitope peptides. PBMC were sampled from 2 *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys (3096, 8998) that were chronically infected with SHIV-KB9, a CXCR4-tropic pathogenic cloned chimeric virus constructed with a clade B HIV-1 *env* having a p41A sequence of YAPPITGQI^{31,174-176}. These PBMC were divided into separate populations and cultured in the presence of representative variant p41A peptides : HxB2, variant 1, variant 3, variant 5, variant 6, variant 8, variant 12, and variant 16. We exposed the PBMC to these peptides to expand low frequency clones of p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes in the PBMC that might recognize each variant epitope peptide. The CD8⁺ T lymphocyte populations in these cultures were assessed for their ability to bind a Mamu-A*01 tetramer constructed with the variant peptide used for the in vitro lymphocyte stimulation. The binding of the PBMC populations to these tetramers facilitated a relative quantitation of CD8⁺ T lymphocytes in each of these cultures for recognition of each of the variant epitope peptides (Fig. 2A). Large populations of CD8⁺ T lymphocytes from monkey 3096 recognized the HxB2 and variant 8 peptides; small populations of cells recognized peptide variants 1, 3, 5, and 16; and no cells recognized peptide variants 6 and 12. Similarly, large populations of CD8⁺ T lymphocytes from monkey 8998 recognized the HxB2 and peptide variants 1 and 8; smaller populations of cells recognized peptide variants 3, 12, and 16; and no cells recognized peptide variants 5 and 6. The high frequency of CD8⁺ T lymphocytes in PBMC of these 2 monkeys that recognized the HxB2 and variant 8 peptides is likely explained by the fact that these peptides differ from the p41A epitope peptide of the

infecting virus by only a single amino acid, residue 6, while most of the other variant peptides differ from the sequence of the p41A peptide of the infecting virus at both residues 6 and 8.

We then explored the clonal lineages of the cells that recognized the various mutant epitope peptides. When the variant peptide stimulated PBMC populations were evaluated by gating on CD8⁺ T lymphocytes that bound the HxB2 p41A peptide/Mamu-A*01 tetramer and these gated cell populations were assessed for recognition of the series of variant peptide tetramers, the same pattern of binding to variant peptide tetramers was evident as shown in Fig. 2A (Fig. 2B). This finding suggested that the same population of CD8⁺ T lymphocytes might be recognizing both the HxB2 and each of the variant peptides. To examine this possibility, we first determined the V β gene families employed by these CD8⁺ T lymphocyte populations to recognize the mutant epitopes. Variant epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte populations were isolated by flow cytometric sorting of CD8⁺ T lymphocytes stained with tetramers constructed using each of the variant epitope peptides. These sorted cell populations were subjected to RNA extraction, cDNA was synthesized, and repertoires of V β usage were determined using rhesus monkey V β family-specific primer pairs. In the PBMC of monkeys 3096 and 8998, the cells that recognized all the tested variants of p41A made use predominantly of the V β gene family 13A (Fig. 2C).

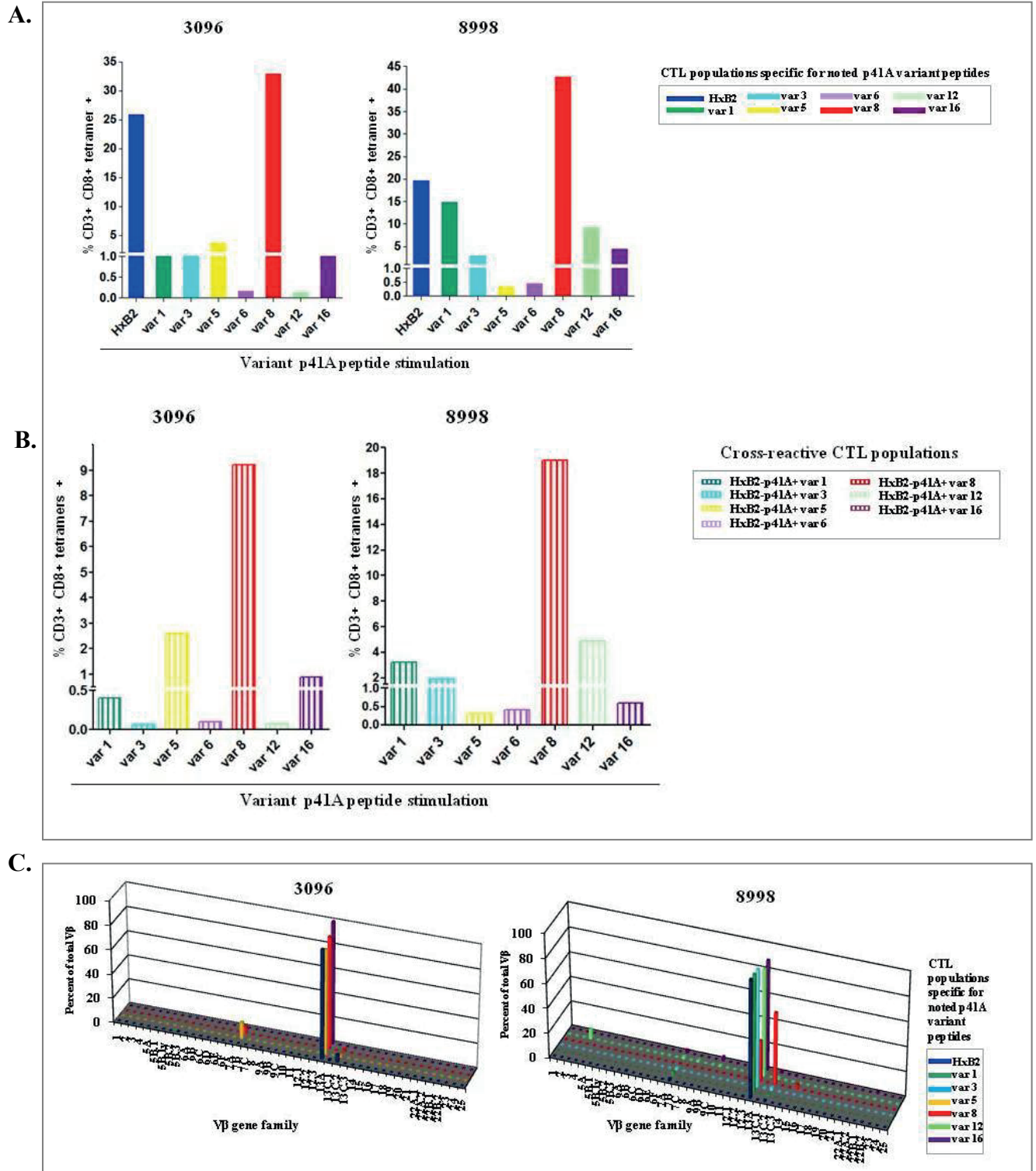


Figure 2. Recognition and cross-recognition of HxB2-p41A and variants of p41A epitope peptides by CD8⁺ T lymphocyte populations elicited in *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from 2 monkeys (8998, 3096) between days 290 and 314 following SHIV-KB9 infection. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in presence of IL-2 with the HxB2-p41A or 7 other variant p41A epitope peptides, and then stained with tetramers specific for HxB2-p41A and the other variants of p41A (listed in Figure 1C).

A. Each color bar represents the percentage of CD3+CD8+ variant p41A tetramer+ cells in each sample of PBMC following stimulation with that variant peptide. **B.** The hatched bars represent the percentage of CD3+CD8+ variant p41A tetramer+ cells in each sample of PBMC that also stain with the HxB2-p41A tetramer following stimulation with the noted variant peptide. **C.** V β repertoire analysis of variant p41A epitope-specific CD8+ T lymphocyte populations elicited in *Mamu-A*01*+ rhesus monkeys infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from 2 monkeys (8998, 3096) between days 290 and 314 following SHIV-KB9 infection. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in presence of IL-2 with either the HxB2-p41A or 7 other variant p41A epitope peptides, and then stained with tetramers specific for HxB2-p41A and the other variants of p41A. Each CD3+CD8+variant p41A tetramer+ cell populations was isolated by cell sorting. The RNA isolated from each sorted epitope-specific CD8+ T cell population was used as template to generate cDNA for V β repertoire analyses performed by real-time PCR using a C β primer and 46 primers specific for each rhesus monkey V β gene family. Data are presented as the percentages of total V β ($[\frac{\text{number of copies of a V}\beta \text{ gene family} - \text{background}}{\text{number of copies of all V}\beta \text{ gene families} - \text{background}}] \times 100$) for each V β gene family.

To define the precise clonal populations of CD8+ T lymphocytes recognizing each of the variant peptides, we sequenced the CDR3 regions in the cDNA amplified by the V β 13A family-specific primers. Strikingly, the same clonal populations of CD8+ T lymphocytes recognized the variant peptides (Fig. 3). In fact, many of these were public clonotypes; that is, the identical TCR β CDR3 sequences recognizing different variants of the epitope were present in both evaluated monkeys (Fig. 3). These findings indicate that CD8+ T lymphocyte recognition of a diversity of mutant epitope peptides in the SHIV-KB9-infected monkeys is mediated by the same clonal populations of cells.

8998

Vβ 13A

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequence | | | Jβ gene family | Frequency | |
|------------------------------------|---|----|---------------|----------------|-----------|------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | |
| HxB2-p41A YAPPISGQI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 19/42 | |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 4/42 | |
| | CASS MRTG TT PQYF | | | | 1/42 | |
| | CASS QRDD | | PQYF | 1.6 | 1/42 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | | 15/42 | |
| | CASS PRAGD G SPLYF | | | | 1/42 | |
| | CAS T QQGPR | | EKL FF | 1.4 | 1/42 | |
| Variant 1 YAPPIAGNI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 20/63 | |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 7/63 | |
| | CASS MRTG TT PQYF | | | | 3/63 | |
| | CASS QRDD | | PQYF | 1.6 | 1/63 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | | 18/63 | |
| | CASS PRAGD G SPLYF | | | | 1/63 | |
| | CASS LGGHPM NT EAF F | | | 1.1 | 1/63 | |
| | CAVA RSV WD YEQY F | | | 2.7 | 1/63 | |
| | CASS LRGLG EPQ ETQY F | | | 1.1 | 1/63 | |
| | CAS T QQGPR | | | EKL FF | 1.4 | 9/63 |
| CASS LRRYDS GN TVY F | | | 1.3 | 1/63 | | |
| Variant 3 YAPPIQGI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 10/84 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | 1.6 | 68/84 | |
| | CASP VRGAQD NN SPLYF | | | 2.1 | 1/84 | |
| | CASP W D EQ FF | | | 2.1 | 2/84 | |
| | CAS T YWGY G EQ FF | | | 2.7 | 1/84 | |
| | CASS F FD GG EQ FF | | | 2.7 | 1/84 | |
| | CASS LRGLG EPQ ETQY F | | | 2.7 | 1/84 | |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 10/39 | |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 5/39 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | 1.6 | 14/39 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | | 1/39 | |
| | CASS PRAGD G SPLYF | | | 2.7 | 7/39 | |
| | CAVA RSV WD YEQY F | | | 2.7 | 2/39 | |
| Variant 12 YAPPIQGI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 19/41 | |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 4/41 | |
| | CASS IRDWG SK D PQYF | | | 1.6 | 3/41 | |
| | CASS MRTG TT PQYF | | | | 1/41 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | 1.3 | 7/41 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | | 1/41 | |
| | CASS PRAGD G SPLYF | | | 1.3 | 3/41 | |
| | CASS LRRYDS GN T VY F | | | 1.4 | 2/41 | |
| | CAS T QQGPR | | EKL FF | 1.4 | 1/41 | |
| Variant 16 YAPPIAGKI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 3/31 | |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 2/31 | |
| | CASS MRTG TT PQYF | | | 1.6 | 5/31 | |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | | 10/31 | |
| | CASS PRAGD G SPLYF | | | 1.1 | 2/31 | |
| | CASS LGGHPM NT EAF F | | | | 3/31 | |
| | CASS LRRYDS GN T VY F | | | 1.3 | 2/31 | |
| | CAS T QQGPR | | | EKL FF | 1.4 | 3/31 |
| | CASP W D EQ FF | | | 2.1 | 1/31 | |

Figure 3. TCRβ CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in *Mamu-A*01*+ rhesus monkeys infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from monkeys 8998 and 3096 between days 290 and 314 following SHIV-KB9 infection. Cells were cultured for 12-14 days in the presence of IL-2 with either the HxB2-p41A or other variant p41A peptides. RNA was isolated from sorted CD3⁺CD8⁺tetramer⁺ T cells and used to generate cDNA for CDR3 region sequencing. Highlighted sequences recognize more than one variant of p41A. Sequences in bold with frequencies in red were observed in at least two monkeys. Frequencies represent the number of clones with the noted CDR3 sequence / total number of sequenced clones.

3096

Vβ 13A

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequence | | | Jβ gene family | Frequency |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----|-----|----------------|-----------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | |
| HxB2-p41A YAPPISGQI | CASS F FD GG EQ FF | | | 2.1 | 4/14 |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | 1.6 | 4/14 |
| | CASS PRAGD G SPLYF | | | 2.7 | 1/14 |
| | CASS SWG RR ETQY F | | | | 2/14 |
| | CASS QRTG EQ ETQY F | | | 2.1 | 2/14 |
| CAS T LR DS TD PQYF | | | 2.5 | 1/14 | |
| Variant 5 YAPPISGRI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 7/21 |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 13/21 |
| | CASS F FD GG EQ FF | | | 2.1 | 1/21 |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CASS YRVLDA LD PQYF | | | 1.5 | 7/11 |
| | CASS IRDWG ST PQYF | | | | 3/11 |
| | CASS VRGAQD NN SPLYF | | | 1.6 | 1/11 |
| Variant 16 YAPPIAGKI | CASS F FD GG EQ FF | | | 2.1 | 28/28 |

Reactivity with variant epitope peptides of p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from 89.6P Env-vaccinated *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys

To examine the breadth of CD8⁺ T lymphocyte recognition of mutant forms of a virus by PBMC of vaccinated rhesus monkeys, we evaluated CD8⁺ T lymphocyte recognition of the variant sequences of the HIV-1 p41A epitope in monkeys following immunization with 89.6P Env, a clade B Env. Three *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys (AW2P, AW28, and AW13) were vaccinated with HIV-1 89.6P Env using either a plasmid DNA prime/rAd5 boost or a rAd5 prime/rAd5 boost regimen. Peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes from these vaccinated animals were assessed for reactivity with the series of tetramers constructed using the variant peptides as described above. As in the SHIV-KB9-infected monkeys, following variant p41A peptide stimulation, large populations of CD8⁺ T lymphocytes from these 3 monkeys recognized the 89.6P, HxB2 and variant 8 p41A peptides; smaller populations of cells recognized peptide variants 1 and 5 (Fig. 4A). Therefore, while the monkeys were vaccinated with the 89.6P Env, a number of variant forms of the p41A epitope peptide were recognized by PBMC of the vaccinated monkeys.

We then assessed whether the same vaccine-induced CD8⁺ T lymphocyte populations in these monkeys that recognized the p41A sequence of the vaccine strain of HIV-1 Env also recognized the variant peptides. PBMC populations from the vaccinated monkeys were stimulated with each of the variant p41A peptides and then assessed for binding simultaneously to a tetramer constructed with the variant peptide used for stimulation of the PBMC and a tetramer constructed with either the 89.6P (Fig. S1A) or the HxB2 p41 (Fig. S1B) peptide. A substantial proportion of the CD8⁺ T lymphocytes that bound to tetramers constructed with either variant peptides 1, 5, or 8 also bound to tetramers constructed with either the 89.6P or HxB2 p41A peptide.

This finding suggested that the same population of CD8+ T lymphocytes might be recognizing both the 89.6P or HxB2 p41A and each of the variant peptides.

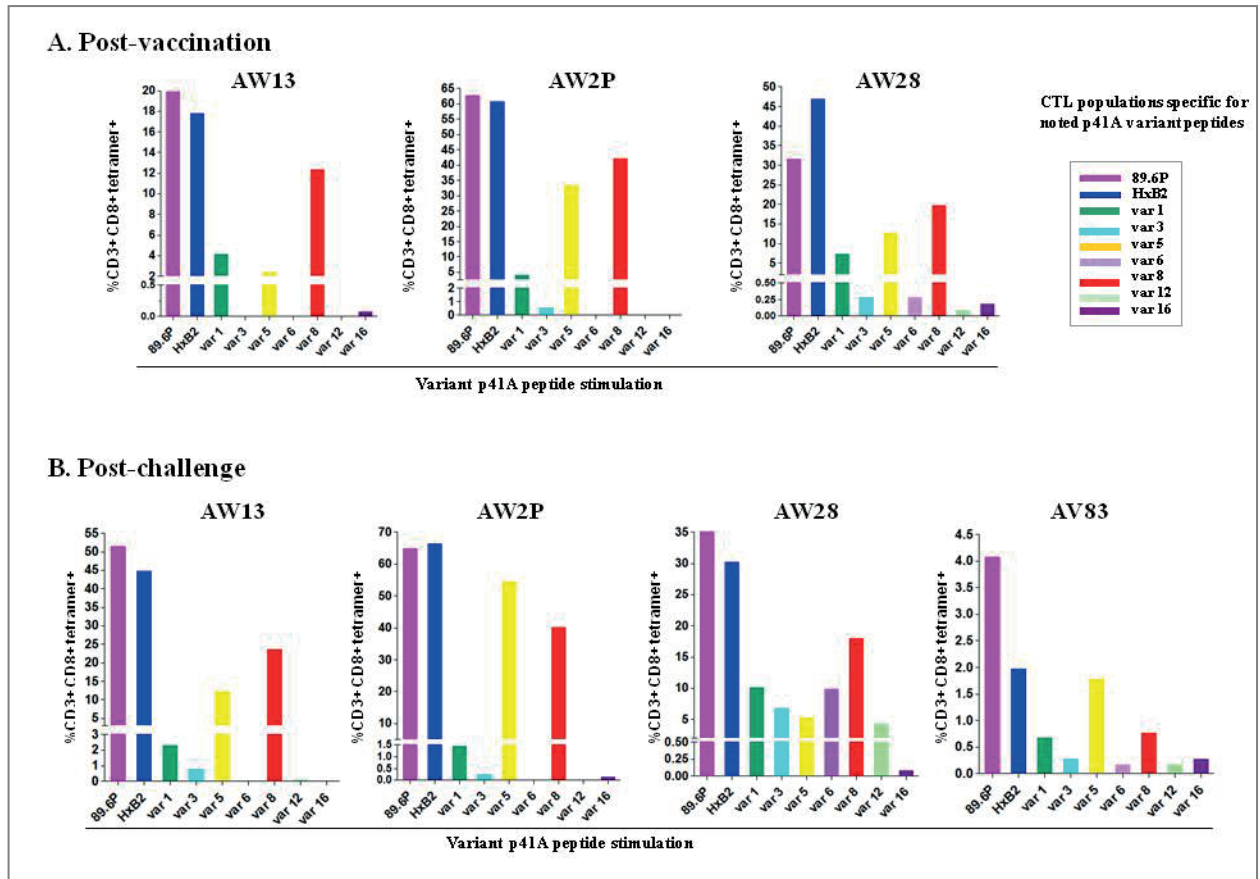


Figure 4. Recognition of 89.6P-p41A, HxB2-p41A and 7 other variant p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized Mamu-A*01+ rhesus monkeys that were later infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from 3 monkeys (AW13, AW2P, AW28) after vaccination and from 4 monkeys (AV83, AW13, AW2P, AW28) on day 141 following challenge. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2, with the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides, and then stained with tetramers specific for 89.6P-p41A, HxB2-p41A or other variants of p41A (listed in Figure 1C). Each color bar represents the percentage of CD3+CD8+ variant p41A tetramer+ T cells in each sample of cultured PBMC. **A.** After immunization. **B.** After SHIV-KB9 challenge.

To confirm that the cross reactivity of the CD8⁺ T lymphocyte populations was a consequence of the 89.6P Env immunization and not due to the in vitro peptide stimulation of the PBMC, we isolated PBMC from the same 3 vaccinated monkeys, stimulated them in vitro with the 89.6P-p41A peptide (Fig. S2A) or the HxB2-p41A peptide (Fig. S2B), and assessed the ability of these cells to bind tetramers constructed with 89.6P, HxB2, or the variant peptides. The pattern of cross reactivity of these peptide-stimulated CD8⁺ T lymphocyte populations was comparable to that of the variant peptide-stimulated cells. Thus, we could demonstrate by tetramer staining and flow cytometric analysis that immunization with a single HIV Env sequence generated populations of CD8⁺ T lymphocytes capable of recognizing diverse forms of an epitope of Env.

Reactivity of p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes from 89.6P Env-vaccinated, SHIV-89.6P challenged *Mamu-A*01*+ rhesus monkeys

We then used the same strategy to examine the breadth of CD8⁺ T lymphocyte recognition of variant epitope sequences in monkeys that were vaccinated and then challenged with SHIV-KB9. PBMC populations from the vaccinated/challenged monkeys were stimulated in vitro with each of the variant p41A peptides and then assessed for binding to tetramers constructed with the variant peptides. The same relative proportion of CD8⁺ T lymphocytes bound to tetramers constructed with these variant p41A peptides as was seen in the PBMC of the monkeys that were vaccinated but not challenged (Fig. 4B). However, presumably because the percentages of CD8⁺ T lymphocytes that bound these tetramers were greater in the vaccinated/challenged monkeys than those seen following vaccination

alone, a small percent of CD8⁺ T lymphocytes binding to tetramers constructed with variant peptides 1, 3, 6, and 12 was also detected in PBMC of some of the monkeys. Therefore, the reactivity of CD8⁺ T lymphocytes with variant peptides that was observed pre-challenge was maintained post-challenge (Fig. S3A, B). Moreover, this reactivity was not a consequence of the *in vitro* stimulation of the CD8⁺ T lymphocytes with the variant peptides (Fig. S4A, B). Thus, the breadth of CD8⁺ T lymphocyte recognition of variant peptides was maintained following virus challenge in these vaccinated monkeys.

We then determined the V β gene families employed by these vaccine-induced CD8⁺ T lymphocyte populations that recognized the wild-type and variant epitopes. p41A and variant p41A epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte populations were isolated by flow cytometric sorting of CD8⁺ T lymphocytes stained with tetramers. The sorted cell populations were subjected to RNA extraction, cDNA was synthesized, and repertoires of V β usage were determined using rhesus monkey V β family-specific primer pairs. In contrast to the highly focused V β 13A gene usage of the CD8⁺ T lymphocytes that recognized p41A and variants of p41A in the 2 monkeys chronically infected with SHIV-KB9 (Fig. 2C), the 3 evaluated vaccinated rhesus monkeys employed multiple V β gene families to generate this CD8⁺ T lymphocyte response (Fig. 5). To generate their p41A/p41A variant epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte responses, monkey AW13 employed the 4, 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2, 15 and 23 V β gene families; monkey AW2P employed the 4, 9A, 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2, and 15 V β gene families; and monkey AW28 employed the 7B, 12.3, 13A, and 13C.2 V β gene families.

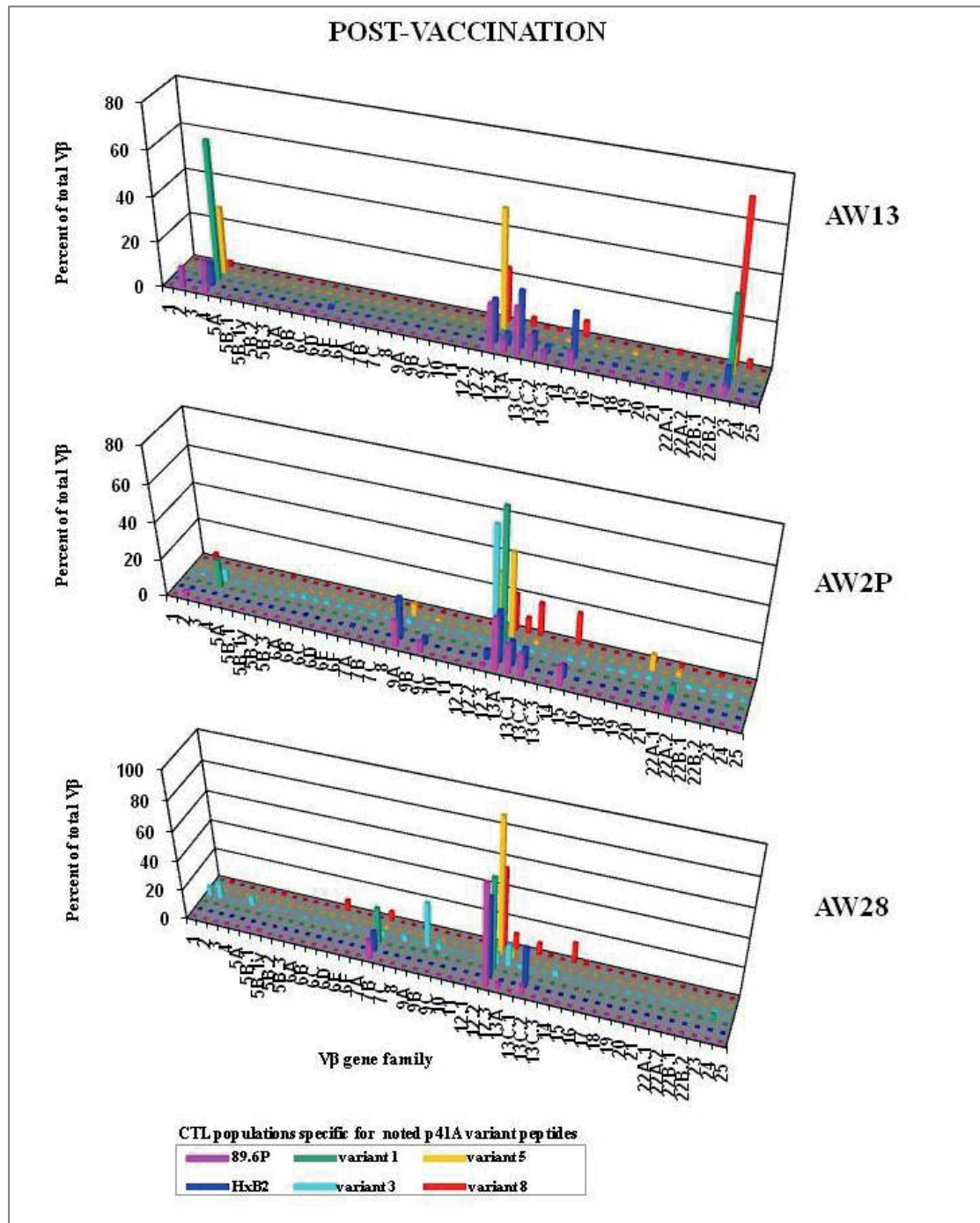


Figure 5. Vβ repertoire analysis of variant p41A epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys. PBMC were isolated from monkeys AW13, AW2P and AW28 after vaccination. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2, with either the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides, and then stained with tetramers specific for 89.6P-p41A, HxB2-p41A or other variants of p41A. Each CD3⁺CD8⁺variant p41A tetramer⁺ cell population was isolated by cell sorting. The RNA isolated from each sorted epitope-specific CD8⁺ T cell population was used as template to generate cDNA for Vβ repertoire analyses performed by real-time PCR using a Cβ primer and 46 primers specific for each rhesus monkey Vβ gene family. Data are presented as the percentages of total Vβ.

Following SHIV-KB9 challenge, the 4 evaluated monkeys employed a similarly broad repertoire of V β gene families to generate their p41A/p41A variant epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte responses (Fig. 6).

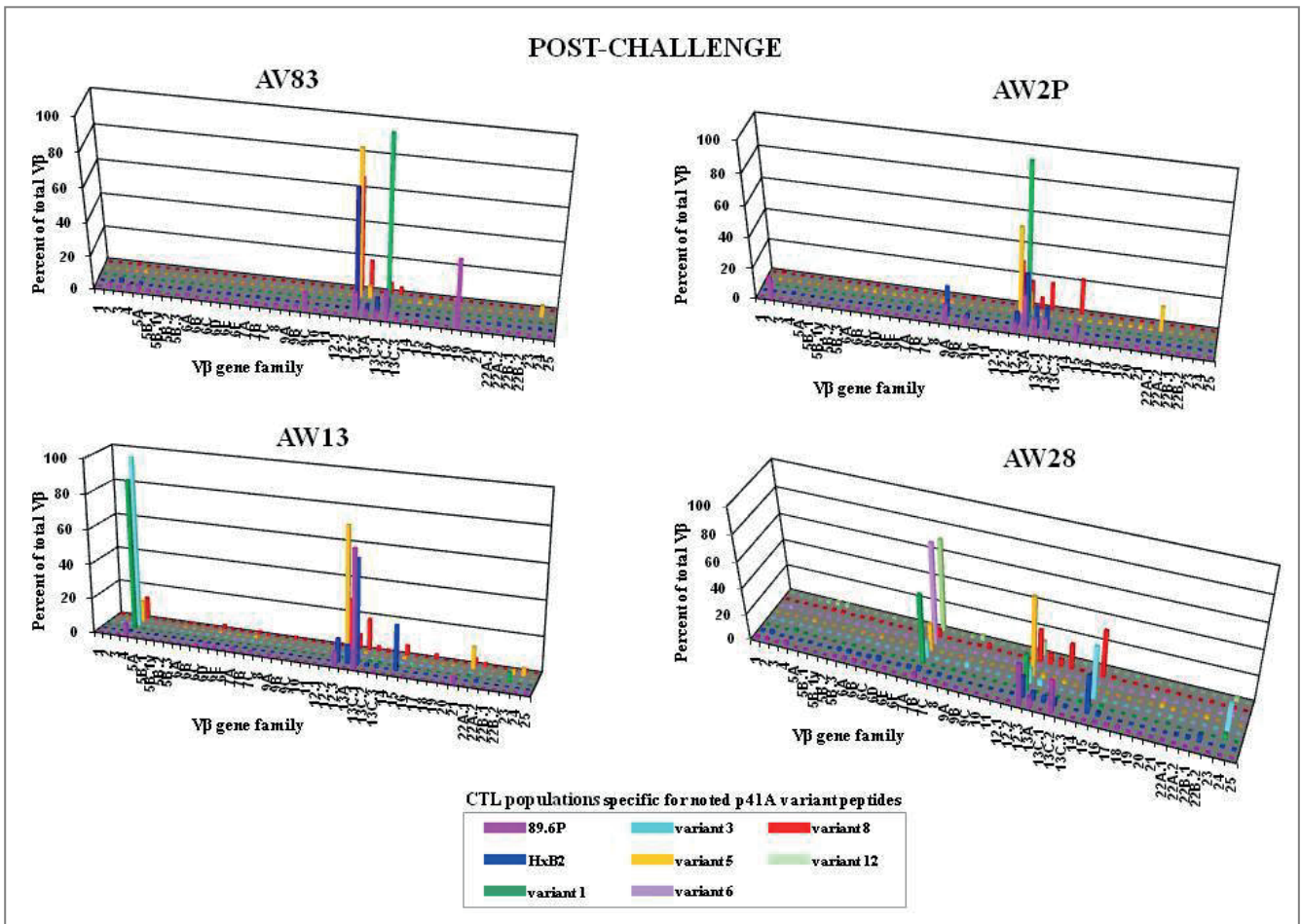


Figure 6. V β repertoire analysis of variant p41A epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01*+ rhesus monkeys infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from 4 monkeys (AV83, AW13, AW2P and AW28) day 141 following infection. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2, with either the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides, and then stained with tetramers specific for 89.6P-p41A, HxB2-p41A or other variants of p41A. Each CD3⁺CD8⁺variant p41A tetramer⁺ cell population was isolated by cell sorting. The RNA isolated from each sorted epitope-specific CD8⁺ T cell population was used as template to generate cDNA for V β repertoire analyses performed by real-time PCR using a C β primer and 46 primers specific for each rhesus monkey V β gene family. Data are presented as the percentages of total V β .

Monkey AW2P employed the 9A, 12.3, 13A, 13C.1, 13C.2, and 15 V β gene families; monkey AW28 employed the 7B, 12.3, 13A, 13C.2, and 15 V β gene families; monkey AW13 employed the 4, 12.3, 13A, 13C.1, and 15 V β gene families; and monkey AV83 employed the 12.3, 13A, 13C.2 and 19 V β gene families to generate their p41A/p41A variant epitope-specific CD8⁺ T lymphocyte responses.

We next defined the clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes recognizing each of the variant peptides in the 4 monkeys that were immunized and then challenged with SHIV-KB9. We carried out this analysis twice, first following vaccination and then following challenge. To accomplish this, we sequenced the CDR3 regions in the cDNA amplified by the V β family-specific primers for all V β families that were employed by an individual monkey for recognition of at least 3 variant forms of p41A at 2 different time points (Fig. 7 and Figs. S5, S6, and S7). In monkey AW28, the vaccine-induced p41A- and variant p41A-specific CD8⁺ T lymphocyte populations using the V β 7B and V β 12.3 gene families employed very limited numbers of clones (Fig. 7). In contrast to that finding, the V β 13A and V β 13C.2 cDNA of monkey AW28 were derived from diverse clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes. A similar mix of highly restricted and diverse clonal populations of p41A- and p41A variant-specific CD8⁺ T lymphocytes was seen in the other 3 vaccinated monkeys (Figs. S5, S6, and S7). Following SHIV-KB9 challenge, these monkeys were again assessed for the clonality of their CD8⁺ T lymphocyte responses to p41A and variants of this epitope peptide (Fig. 7, S5, S6, and S7). There was an increased focusing of the clonal response demonstrated in both the V β repertoire analyses and CDR3 sequencing data, with an increase in the representation of the clonal populations of cells that were the most dominant prior to challenge.

There was no evidence for an enrichment of the public clonotypes in these monkeys following the virus challenge.

AW28

A. Post-vaccination

B. Post-challenge

Vβ 7B

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|---|----------------|----------------------------------|
| 89.6P-p41A YAPPI TGQI | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGGDRGPSS YEQYF | 2.7 | 103/105 2/105 |
| HxB2 YAPPI SGQI | CASS QGGGRGPSS YEQYF CAGS QGGGRGPSS YEQYF CASS RGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 103/106 2/106 1/106 |
| Variant 1 YAPPI AGNI | CASS QGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 113/113 |
| Variant 3 YAPPI OGVI | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS GGSP YEQYF | 2.7 | 91/110 1/110 15/110 |
| | CVSS GGSP YEQYF CASS IRRSG AQLFF CASS LSLGGGSSN EKLFF | 2.2 | 1/110 1/110 1/110 |
| | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGGGRGPSS YQYF | 2.7 | 104/105 1/105 |
| Variant 8 YAPPI AGQI | CASS QGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 108/108 |

Vβ 12.3

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|---|----------------|--|
| 89.6P-p41A YAPPI TGQI | CASS EYGLL YEQYF | 2.7 | 118/118 |
| HxB2 YAPPI SGQI | CASS EYGLL YEQYF | 2.7 | 112/112 |
| Variant 1 YAPPI AGNI | CASS EYGLL YEQYF CASS FHGLL YEQYF CAST RGDRLD YEQYF | 2.7 | 101/125 2/125 4/125 |
| | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS RDWVEN EQFF CASY RAGTGRYN EQFF CASS DGTGRN EQFF | 2.1 | 11/125 2/125 3/125 2/125 |
| | CASS EYGLL YEQYF CASS QGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 116/119 3/119 |
| | CASS EYGLLYG QYF CASS EYGLL YEQYF | 2.7 | 109/111 1/111 |
| Variant 5 YAPPI SGRI | CASS EYGLL YEQYF CASS EYGLL YEQYF | 2.7 | 102/104 1/104 |
| Variant 8 YAPPI AGQI | CASS EYGLL YEQYF CASR EYGLLYD QYF CASS EYGLLYQ QYF | 2.7 | 1/104 1/104 1/104 |

Vβ 7B

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|--|----------------|--|
| 89.6P-p41A YAPPI TGQI | CASS QGGGRGPSS YEQYF CACS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGSGRPSS YEQYF CASS QGGGRGPSS YQYF CASS QGVWGRDT AQLFF | 2.7 | 40/45 1/45 1/45 1/45 1/45 |
| | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGGGRGPSS YEQYF CAVA RSVWD YEQYF | 2.7 | 48/50 1/50 1/50 |
| | CASS QGGGRGPSS YEQYF CANS QGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 48/49 1/49 |
| | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 38/39 1/39 |
| Variant 5 YAPPI SGRI | CASS QGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 52/52 |
| Variant 6 YAPPI EGLI | CASS QGGGRGPSS YEQYF CARS QGGGRGPSS YEQYF CARS QGGGRGPSS YQYF CASS QGDDRGPS YEQYF | 2.7 | 46/52 4/52 1/52 1/52 |
| | CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS HGGGRGPSS YEQYF | 2.7 | 44/46 1/46 1/46 |
| Variant 12 YAPPI OGII | CASS QGGGRGPSS YEQYF CVSS QGGGRGPSS YEQYF CASS HGGGRGPSS YEQYF CASS HWGGKGPSS YEQYF | 2.7 | 52/56 1/56 1/56 1/56 |

Vβ 13A

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|---|----------------|--|
| 89.6P-p41A YAPPI TGQI | CAST PWGSSNQ POYF CAST PWGSSNQ POYF CASS PRRIRD POYF | 1.5 | 71/106 1/106 1/106 |
| | CASS FNPSGAS VLTF CASS SRGLTIG EQYF CASS FWTGSD EQYF CASS FWTGSD QYF | 2.6 | 4/106 7/106 19/106 1/106 |
| | CASS ENRRI AQLFF CASS YKGO POYF CASS YSVRD EQYF | 2.2 | 2/106 1.5 2/104 |
| | CASS SWGRR ETQYF CASS PDRRGD EQYF CASS PDRRGD KYEYF CASS PCRGEA QYF CATS RG EKLFF | 2.7 | 9/104 14/104 1/104 1/104 1.4 |
| | CASS DRDPR EQFF CASS YRGTD DYTE CASS LDRGNY DYTE | 2.1 | 3/104 1/104 16/104 |
| | CASS ENRRI AQLFF CASS PWGSSNQ POYF CASS YKGO POYF CASS PGLGG POYF CASS YSVRD EQYF CASS EYGLL YEQYF | 1.5 | 6/69 2/69 1/69 5/69 45/69 |
| Variant 5 YAPPI SGRI | CASS IDTN YEQYF CASS YWVREYN QYF CASS LDRRDG EQYF CASS YVSSYG EQFF CASS LRVA EAFF CASS PRAGDG SPLYF CASS ENRRI AQLFF | 2.1 | 3/69 1/69 2/69 1/69 1.1 1/69 2.2 |
| | CAST PWGSSNQ POYF CAST PWGSSNH POYF CAST YKGO POYF CAST YRGO POYF CASS SRGLTIG EQYF CASS EYGLL YEQYF CASS QGGGRGPSS YEQYF CASS EYTGSS YEQYF CASS FNPSGAS VLTF CASS YWGKSO NIOYF CASS LDRRDG EQYF CATS DPLTDINY DYTE | 2.7 | 88/125 1/125 3/125 1/125 24/125 2/125 1/125 1/125 2.6 2.4 2.1 1/125 |

Vβ 13C2

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|---|----------------|--|
| 89.6P-p41A YAPPI TGQI | CASR EYTGSS YEQYF CASS EWGRK YEQYF CASS DWGVYG EQFF CASR DWGVYS EQFF CASR DCGYR EQFF | 2.7 | 60/104 1/104 41/104 1/104 1/104 |
| | CASR EYTGSS YEQYF CVSR EYTGSS YEQYF CASS EWGRK YEQYF CASS EWMGGD YEQYF CASR EWMGGD YEQYF CASR EWGGK YEQYF CASS EWGGK YEQYF CASS FNPSGAS VLTF CASS EYGTDN EKLFF | 2.7 | 77/102 1/102 14/102 4/102 1/102 2/102 1/102 1/102 1.4 |
| Variant 8 YAPPI AGQI | CASR EYTGSS YEQYF CASR FTGS YEQYF CASR ECTGS YEQYF CASS EWMGGD YEQYF CASS EWGRK YEQYF CASS EYGTDN EKLFF CASR AIQGGGG EKLFF | 2.7 | 62/90 1/90 1/90 1/90 1/90 23/90 1/90 |

Figure 7. TCRβ CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkey infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from monkey AW28 after vaccination and day 141 following infection. Cells were cultured for 12-14 days in the presence of IL-2 with either the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides. RNA was isolated from sorted CD3⁺CD8⁺ tetramer⁺ T cells and used to generate cDNA for CDR3 region sequencing. Highlighted sequences recognize more than one variant of p41A. Sequences in bold with frequencies in red were observed in at least two monkeys. Frequencies represent the number of clones with the noted CDR3 sequence / total number of sequenced clones. A. Post-vaccination; B. Post-challenge.

Cytokine responses of variant p41A epitope peptide-specific CD8⁺ T lymphocytes following epitope peptide exposure

These findings suggest that the same clones of CD8⁺ T lymphocytes that expand following initial exposure to the p41A epitope peptide recognize variants of that epitope peptide. Moreover, the data suggest that minor clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes are not employed in the recognition of variant epitope peptides. Rather, the same predominant clones of T cells that recognize the p41A epitope peptide are preferentially employed to recognize the variant epitope peptides. These variant peptides can be viewed as models for viral sequences that have mutated to escape from recognition by CD8⁺ T lymphocytes. These findings raise the question of why these variants might emerge, since they are recognized by clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes that should already exist in substantial numbers in infected individuals.

It is possible that the variant forms of the p41A peptide trigger the functions of the epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes less efficiently than the wild-type p41A peptide. To explore this possibility, PBMC from 2 monkeys that were immunized with 89.6P Env and then challenged with SHIV-KB9 were exposed *in vitro* for 6 hours to serial dilutions of the 89.6P-p41A peptide or variants of that epitope that differed from the wild-type sequence by a single amino acid at either position 6 or 8 of the epitope.

The peptide stimulated epitope-specific lymphocyte populations were then assessed for production IFN- γ , TNF- α , and IL-2 (Fig. 8, S8).

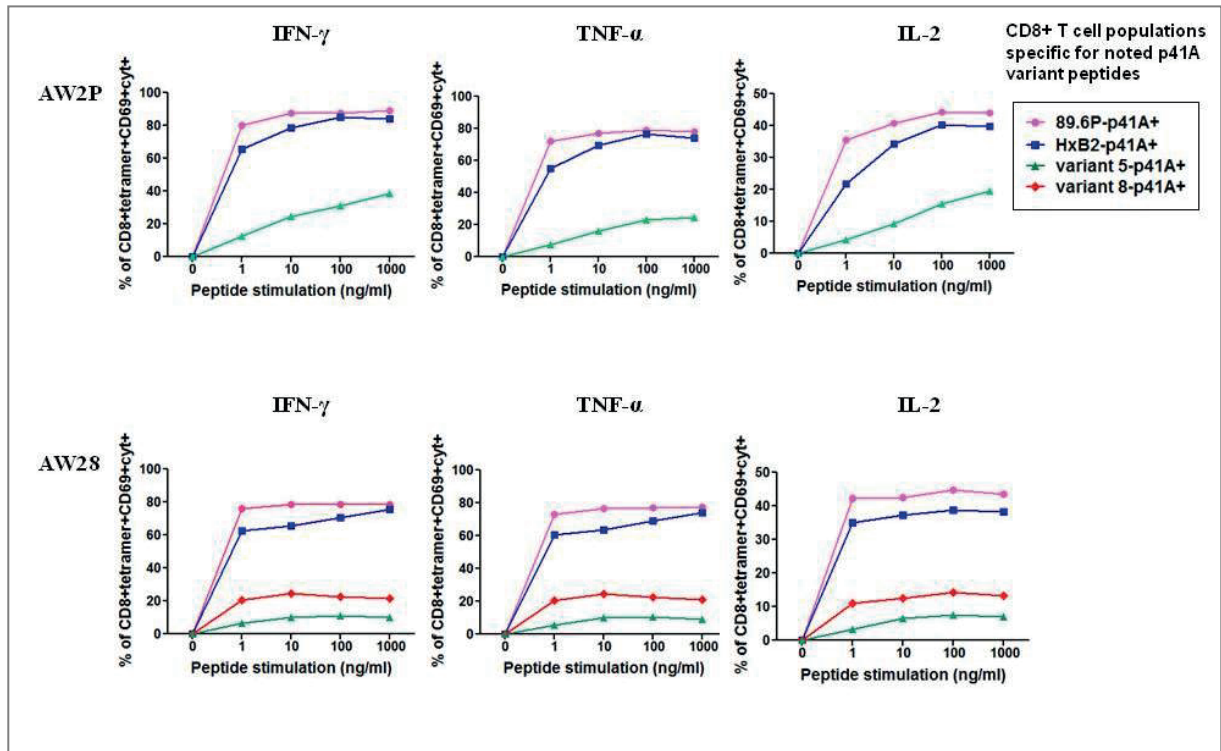


Figure 8. Cytokine production of variant-p41A-specific CD8+T lymphocytes elicited in Mamu-A*01+ rhesus monkeys immunized with 89.6P Env and infected with SHIV-KB9. PBMC from monkeys AW2P and AW28 were isolated between day 17 and day 31 after infection with SHIV-KB9 and stimulated in vitro for 6 hours with serial dilutions of 89.6P-p41A, HxB2-p41A, variant 5-p41A or variant 8-p41A epitope peptide. Cells were then stained using a cell viability marker, tetramers specific for 89.6P-p41A, HxB2-p41A, variant 5-p41A or variant 8-p41A epitope peptides, and antibodies specific for CD4 and CD8. After permeabilization, intracellular staining was performed using a cocktail of antibodies specific for CD3, CD69, IFN- γ , TNF- α , and IL-2. The plotted data represent the percentage of CD8+tetramer+CD69+ cells producing one of the tested cytokines.

While the HxB2 p41 peptide stimulated cytokine production that was comparable to that stimulated by the 89.6P p41A peptide, variant forms 5 and 8 of p41A stimulated substantially less cytokine production. This finding suggests that a number of these variant forms of the epitope peptide interact with CD8+ T lymphocytes when presented in association with MHC class I molecules, but do not efficiently stimulate CD8+ T lymphocyte function. This finding provides a mechanistic basis for how these variants might escape from control by CD8+ T lymphocytes.

DISCUSSION

In the present study, we combined tetramer staining, V β repertoire analysis, and complementary-determining region 3 sequencing to assess the clonality of CD8⁺ T lymphocytes recognizing variant p41A epitope peptides from diverse clades of HIV-1 envelope. These epitope-specific CD8⁺ T cell populations were evaluated in Mamu-A*01⁺ rhesus monkeys immunized with 89.6P Env and subsequently challenged with SHI-KB9, and were compared to those elicited in unvaccinated monkeys that were infected with SHIV-KB9. Importantly, we measured the function of these CD8⁺ T lymphocytes recognizing variant p41A epitope peptides by intracellular cytokine staining. Our findings suggest that while vaccine-induced lymphocytes are capable of recognizing diverse forms of the viral epitope, they do not function equally when they engage variant epitope ligands. Therefore, these vaccine-elicited cell populations may not confer sufficient protection against divergent clades of HIV-1.

The selection of HIV-1 variants is driven to a large extent by immune pressure on the virus arising from both neutralizing antibodies and CD8⁺ T lymphocytes. While the specificity of the neutralizing antibody pressure on the envelope of an immunodeficiency virus is likely similar when it evolves in an HIV-1-infected human or SHIV-infected rhesus monkey, the specificity of CD8⁺ T lymphocytes may differ in these host species. Since rhesus monkeys and humans do not share identical T cell receptor repertoires and have distinct MHC class I molecules, the epitopes of the virus recognized by CD8⁺ T lymphocytes in these species will often differ. These

differences likely translate into distinct patterns of viral sequence evolution in monkeys and man. The variants of p41A chosen for evaluation in the present study arose in HIV-1-infected humans, but these variants were assessed for recognition by rhesus monkey CD8⁺ T lymphocytes. This difference in host species may have introduced a bias into the results of the present study.

Most studies performed to assess the clonality of a T cell population make use of CDR3 sequencing alone; data on V β family usage is derived from these CDR3 sequences. The present study was done using carefully selected rhesus monkey V β -specific primer pairs to carry out formal V β repertoire analyses on sorted CD8⁺ T lymphocyte subpopulations. The clonal constituents of the responding CD8⁺ T lymphocyte populations were then determined by characterizing CDR3 sequences in the selectively amplified V β family-specific cDNA. This experimental strategy was employed in the present study to simplify the assessment of changes in the responding clonal populations of CD8⁺ T lymphocytes that occurred in vaccinated monkeys that were then challenged with a SHIV isolate.

In the context of infection with SHIV-KB9, we observed a restricted V β usage. However, the CDR3 sequencing showed that the recognition of variant p41A epitope peptides is mediated by diverse clonotypes present in all chronic infected monkeys. Conversely, after an Env immunization, all vaccinated monkeys recognized those variants by a broad V β usage. The CDR3 sequencing confirmed that a large number of clonotypes interacted with most of the tested variants. However, after SHIV-KB9 challenge, there appeared to be a focusing of the CD8⁺ T cell population

towards particular clonotypes. The most frequent associated with the major V β gene families taking part of the recognition of most of the tested variants are maintained post challenge.

The 3 different assays used in the present study to assess T cell receptor – peptide/MHC class I interactions yielded different results. The peptide/MHC class I binding assay could not differentiate between the wild-type and a number of the variant peptides in their binding to Mamu-A*01. The tetramer binding assays demonstrated little difference in the binding of CD8⁺ T lymphocytes to a number of the variant peptides in association with Mamu-A*01. In contrast, a number of these variant peptides that could not be differentiated from the wild-type epitope sequence peptide differed significantly in their ability to stimulate the secretion of a number of cytokines by the epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes. It was therefore important to evaluate these interactions of lymphocytes and epitope peptides using a number of different assays.

The present study demonstrates that immunization with a single Env sequence generates a population of CD8⁺ T lymphocytes that recognizes diverse variants of an Env epitope. A single amino acid substitution in this epitope sequence was not associated with a significant decrement in epitope recognition by the established Env-specific CD8⁺ T lymphocyte population. However, peptide sequences varying by 2 amino acids from the sequence used to immunize the monkeys were associated with some decrease in lymphocyte recognition of the epitope. This decrement in recognition was not a consequence of diminished epitope peptide binding to the MHC

class I molecule Mamu-A*01 that presents the peptide to CD8⁺ T lymphocytes, since the binding of these variant epitope peptides was equivalent in the peptide/MHC class I binding assay. Therefore, these differences in epitope recognition likely reflect differences in T cell receptor – peptide/MHC class I interactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Patrick Autissier and Lauren Dorosh for sorting the tetramer + cells by FACS. We are also grateful to Michelle Lifton for technical assistance with flow cytometry.

This work was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (Grant AI067854).

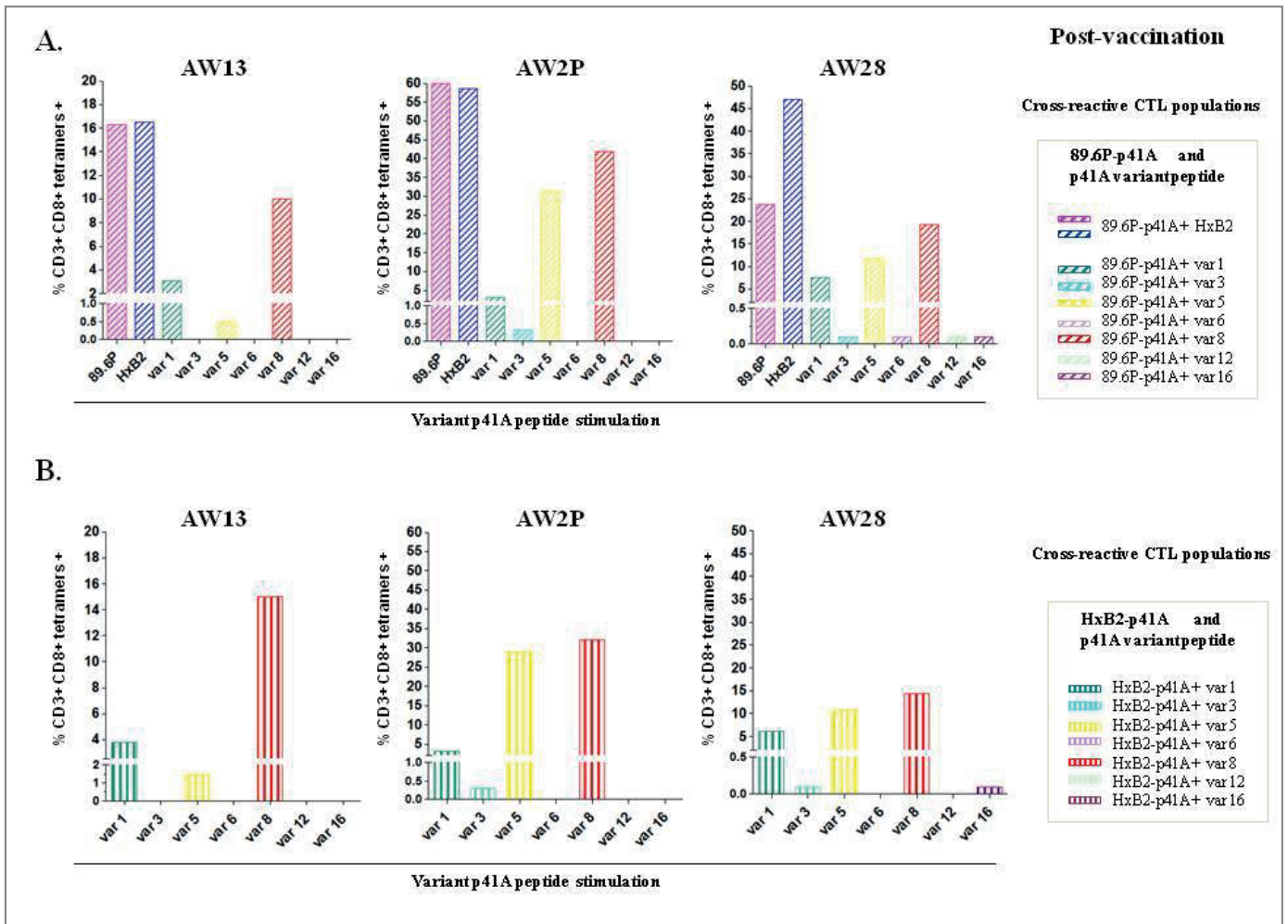
AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.L.H. and N.L.L. designed the study and S.L.H. conducted and performed the peptide binding assays, tetramer binding assays, V β repertoire analysis, TCR β CDR3 sequencing and intracellular staining of cytokines. B.T.K., S.L.H. and N.L.L. chose the variant epitope peptides tested in the peptide binding assays. E.M.C. participated in the binding assays and construction of tetramers. S.L.H., E.M.C., B.T.K. and N.L.L. performed the data analysis. N.L.L. and S.L.H. wrote the manuscript.

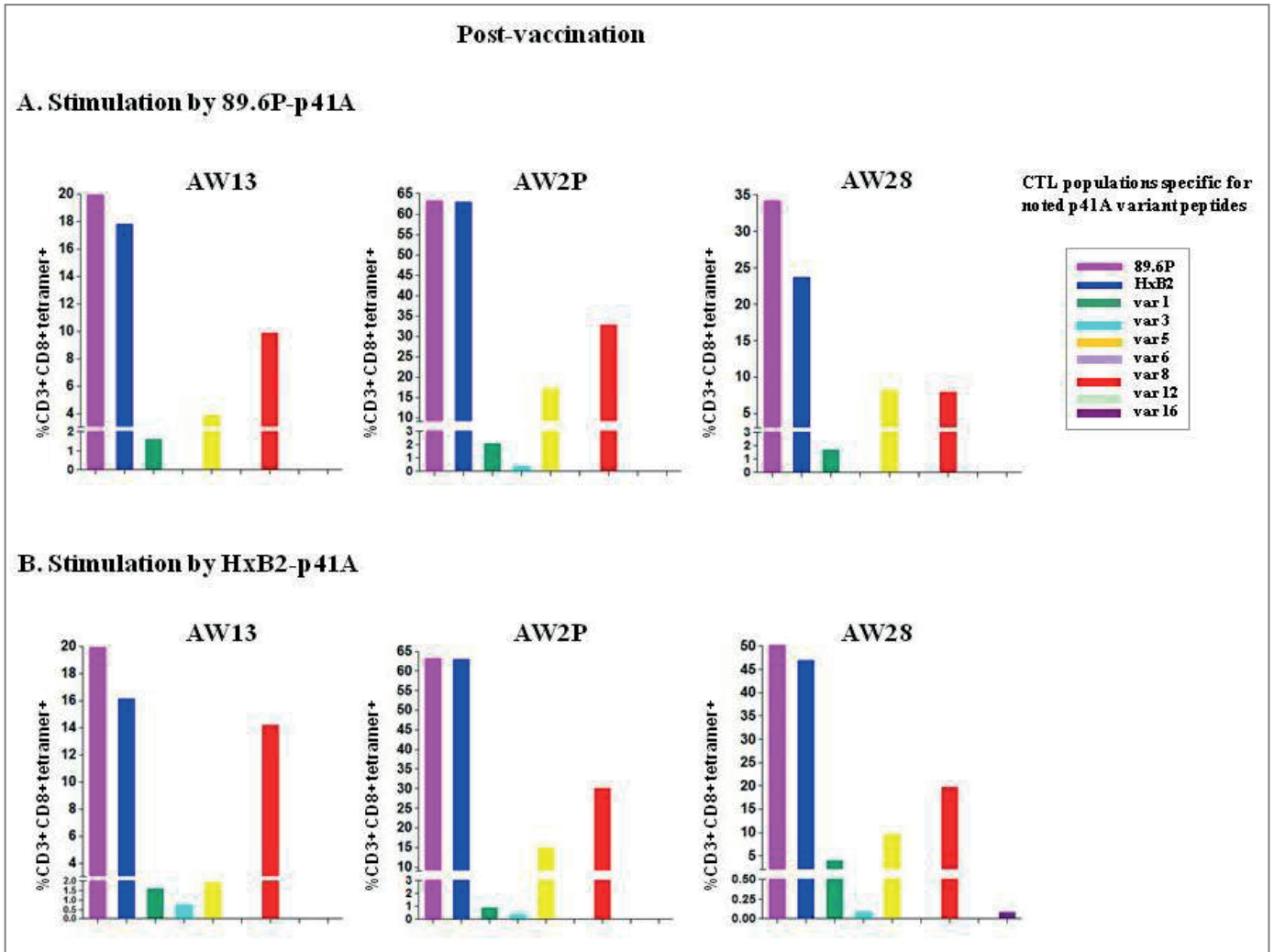
COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

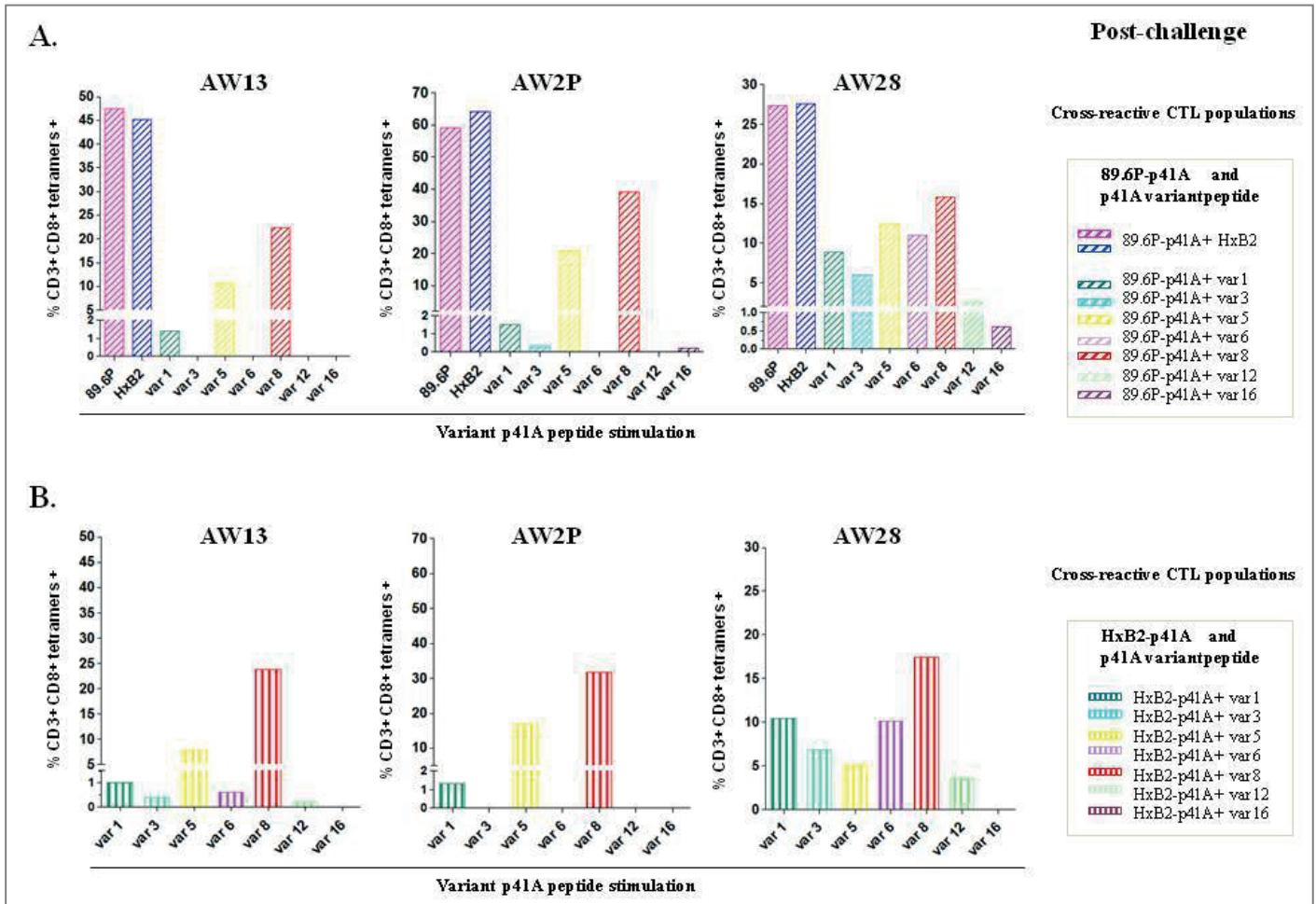
SUPPLEMENTAL FIGURES



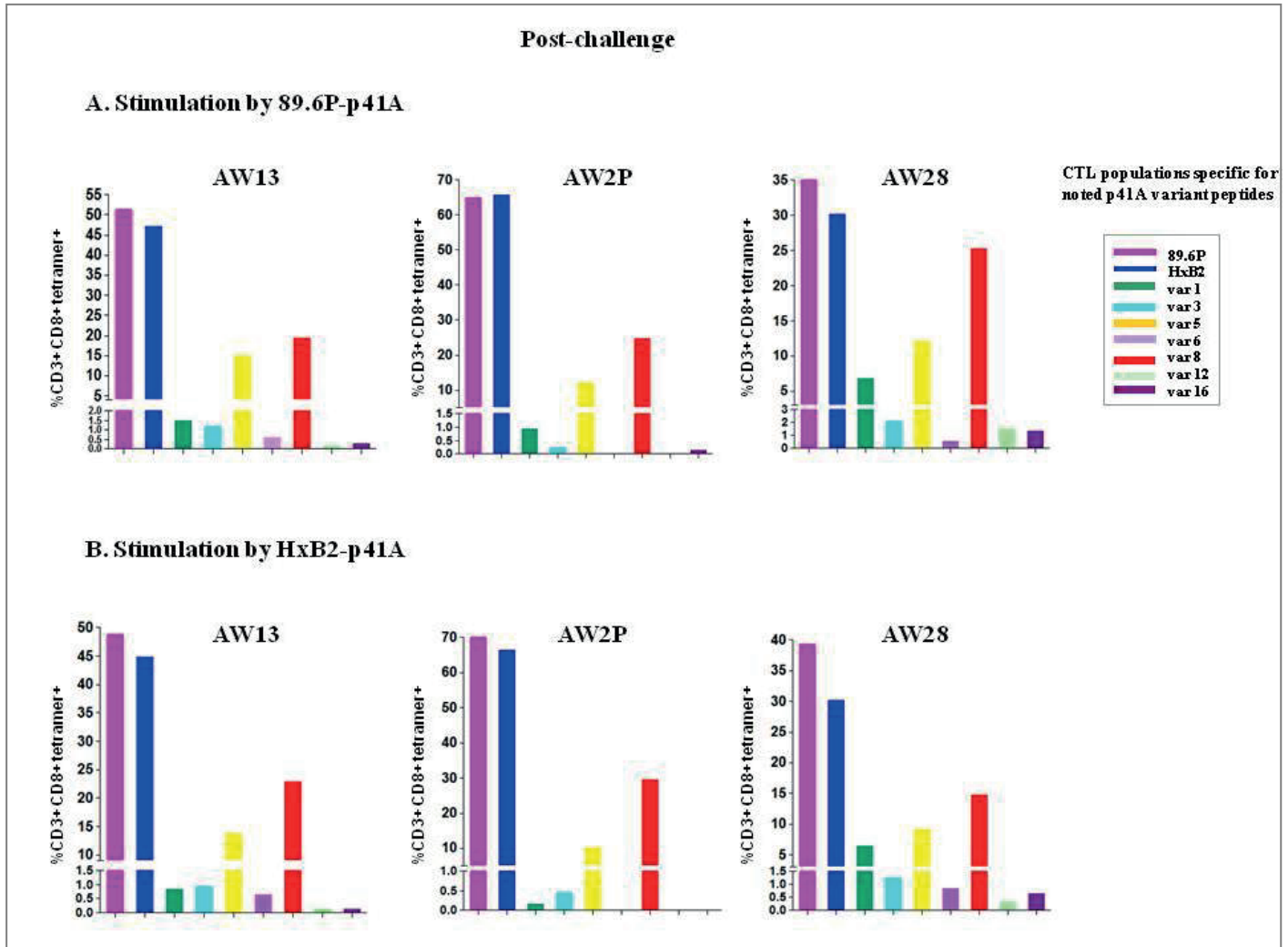
Suppl. Figure 1. Cross-recognition of 89.6P-p41A, HxB2-p41A and 7 other variant p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkeys. PBMC were isolated from 3 monkeys (AW13, AW2P, AW28) after vaccination. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in presence of IL-2 with the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides, and then double stained with tetramers specific for 89.6P-p41A or HxB2-p41A and each other variant p41A epitope peptides (listed in Figure 1C). **A.** Diagonally hatched bars represent the percentage of CD3+CD8+T lymphocytes binding the tetramer specific for 89.6P-p41A and tetramers specific for other variant p41A epitope peptides in each sample of cultured PBMC. **B.** Vertically hatched bars represent the percentage of CD3+CD8+T lymphocytes binding the tetramer specific for HxB2-p41A and tetramers specific for other variant p41A epitope peptides in each sample of cultured PBMC.



Suppl. Figure 2. Recognition of diverse variants of p41A by a subset of PBMC elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkeys following stimulation by p41A epitope peptides from selected clade B HIV-1 isolats. PBMC were isolated from 3 monkeys (AW13, AW2P, AW28) after vaccination. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 and the 89.6P-p41A peptide or the HxB2-p41A peptide, and then stained with tetramers specific for 89.6P-p41A, HxB2-p41A or other variants of p41A (listed in Figure 1C). **A.** Stimulation by 89.6P-p41A; **B.** Stimulation by HxB2-p41A. Each color bar represents the percentage of CD3+CD8+ variant p41A tetramer+ cells in each sample of cultured PBMC.



Suppl. Figure 3: Cross-recognition of 89.6P-p41A, HxB2-p41A and 7 other variant p41A epitope peptides by CD8+ T lymphocyte populations elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkeys infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from 3 monkeys (AW13, AW2P, AW28) day 141 following challenge with SHIV-KB9. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 with either the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides, and then double stained with tetramers specific for 89.6P-p41A or HxB2-p41A and each other variants of p41A (listed in Figure 1C). **A.** Bars with diagonal lines represent the percentage of CD3+CD8+T lymphocytes binding the tetramer specific for 89.6P-p41A and tetramers specific for other variant p41A epitope peptides in each sample of cultured PBMC. **B.** Bars with vertical lines represent the percentage of CD3+CD8+T lymphocytes binding the tetramer specific for HxB2-p41A and tetramers specific for other variant p41A epitope peptides in each sample of cultured PBMC.



Suppl. Figure 4. Recognition of diverse variant p41A epitope peptides by a subset of PBMC elicited in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkeys infected with SHIV-KB9, following stimulation by p41A epitope peptides from selected clade B HIV-1 isolates. PBMC were isolated from 3 monkeys (AW13, AW2P, AW28) day 141 following challenge with SHIV-KB9. Cells were cultured in vitro for 12 to 14 days in the presence of IL-2 and the 89.6P-p41A or the HxB2-p41A peptide, and then stained with tetramers specific for 89.6P-p41A, HxB2-p41A or other variants of p41A. **A. Stimulation by 89.6P-p41A; **B.** Stimulation by HxB2-p41A. Each color bar represents the percentage of CD3+CD8+ variant p41A tetramer+ cells in each sample of cultured PBMC.**

AW13

A. Post-vaccination

B. Post-challenge

Vβ 4

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences | | | Jβ gene family | Frequency | | |
|----------------------------------|----------------|------------------|--------------|----------------|-------------|-------------|-------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | | |
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 27/61 | | |
| | CSVP | GRGLN | EQYF | | 1/61 | | |
| | CASS | DWTGSH | EQYF | | 1/61 | | |
| | CASS | EYTG | YEQYF | | 1/61 | | |
| | CASR | EFTGN | YEQYF | | 7/61 | | |
| | CASS | EEGN | EQYF | | 2/61 | | |
| | CATS | TPSFGN | TVYF | | 1.3 | 1/61 | |
| | CASS | SWTDY | SPLYF | | 1.6 | 15/61 | |
| | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | | 2.2 | 4/61 | |
| | CASR | QDRTGHP | AQLFF | | 1/61 | | |
| | CAST | WEH | EKLFF | | 1.4 | 1/61 | |
| | HxB2 YAPPI5GQI | CSVP | GQGLN | | EQYF | 2.7 | 42/54 |
| CASS | | DWTGS | EQYF | 2/54 | | | |
| CSVP | | GLGLN | EQYF | 1/54 | | | |
| CSVP | | GQGFN | EQYF | 1/54 | | | |
| CASS | | IFQGR | NTQYF | 2.4 | 2/54 | | |
| CASS | | LEGTVD | POYF | 1.5 | 3/54 | | |
| CASR | | EFTGVNY | DYTF | 1.2 | 2/54 | | |
| CASS | | SGQTANPNT | AQLFF | 2.2 | 1/54 | | |
| Variant 1 YAPPIAGNI | | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | | 34/35 |
| CASS | | SGQTANPNT | AQLFF | 2.2 | 1/35 | | |
| Variant 5 YAPPI5GII | | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | | 57/58 |
| CAST | | WEH | EKLFF | 1.4 | 1/58 | | |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 39/45 | | |
| | CASS | QGGGRGPSS | EQYF | | 1.4 | 1/45 | |
| | CASS | ESMDRVG | EKLFF | | 1.4 | 1/45 | |
| | CASS | LEGTVD | POYF | | 1.5 | 3/45 | |
| | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | | 2.2 | 1/45 | |

Vβ 12.3

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences | | | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|----------------|----------------|--------------|----------------|-----------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | |
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CAST | WEH | EKLFF | 1.4 | 100/104 |
| | CAGI | WEH | EKLFF | | 1/104 |
| | CVST | WEH | EKLFF | | 1/104 |
| | CASA | WEH | EKLFF | | 1/104 |
| | CASS | SWTDY | SPLYF | | 1.6 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CAST | WEH | EKLFF | 1.4 | 104/109 |
| | CASS | ESMDRVG | EKLFF | | 2/109 |
| | CASS | EYGLL | VEQYF | | 2.7 |
| Variant 5 YAPPI5GII | CAST | WEH | EKLFF | 1.4 | 113/113 |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CAST | WEH | EKLFF | 1.4 | 5/14 |
| | CASS | ESMDRVG | EKLFF | | 107/114 |
| | CASS | ESMYRVG | EKLFF | | 2/14 |

Vβ 13C1

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences | | | Jβ gene family | Frequency | |
|----------------------------------|----------------|------------------|--------------|----------------|------------|-------------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | |
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS | EYTG | YEQYF | 2.7 | 110/112 | |
| | CASS | SWTDY | SPLYF | | 1.6 | 1/112 |
| | CASR | EFTGVNY | DYTF | | 1.2 | 1/112 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS | EYTG | YEQYF | 2.7 | 82/100 | |
| | CASS | GTGFG | YEQYF | | 5/100 | |
| | CASS | EYTGSC | EQYF | | 1/100 | |
| | CAGS | EYTG | EQYF | | 1/100 | |
| | CASS | VYREIN | EKLFF | | 7/100 | |
| | CASA | GGN | EKLFF | | 4/100 | |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CAST | YWGVG | EQFF | 2.1 | 2/86 | |
| | CASS | FFDGG | EQFF | | 2/86 | |
| | CASN | WGVTYN | EQFF | | 1/86 | |
| | CGSS | YWTYG | EQFF | | 1/86 | |
| | CASS | ESMDRVG | EKLFF | | 1.4 | 11/86 |
| | CASS | EFQGG | EKLFF | | 12/86 | |
| | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | | 2.2 | 4/86 |
| | CASS | DWTGS | YEQYF | | 2.7 | 1/86 |
| | CASS | GVV | EQYF | | 3/86 | |
| | CVSP | GQGLN | EQYF | | 2/86 | |
| | CASS | GYQ | NTQYF | | 2/86 | |
| | CASS | GQVR | KTVF | | 45/86 | |
| CTSS | GQVR | KTVF | 1/86 | | | |

Vβ 23

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences | | | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|----------------|------------------|--------------|----------------|-----------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | |
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | 2.2 | 102/103 |
| | CASS | SWTDY | SPLYF | | 1.6 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | 2.2 | 107/107 |
| | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | | 2.2 |
| Variant 1 YAPPIAGNI | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | 2.2 | 98/102 |
| | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | | 1/102 |
| | CASS | SGQTANPNA | AQLFF | | 2/102 |
| Variant 5 YAPPI5GII | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | 2.2 | 105/105 |
| | CASS | SGQTANPNT | AQLFF | | 1/102 |

Vβ 4

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences | | | Jβ gene family | Frequency | |
|----------------------------------|----------------|--------------|-------------|----------------|-----------|-------|
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | |
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 17/20 | |
| | CSVP | GRGLN | EQYF | | 1/20 | |
| | CASS | EYTG | YEQYF | | 1/20 | |
| HxB2 YAPPI5GQI | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 10/14 | |
| | CASS | FIGGE | EQYF | | 2.5 | 1/14 |
| | CASS | GINAEYAGT | EAF | | 1.1 | 3/14 |
| Variant 1 YAPPIAGNI | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 12/12 | |
| | CSVP | GQGLN | EQYF | | 2.7 | 16/34 |
| Variant 5 YAPPI5GII | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 17/34 | |
| | CASS | AWGOGSGN | TVYF | | 1.3 | 1/34 |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CSVP | GQGLN | EQYF | 2.7 | 15/15 | |
| | CSVP | GQGLN | EQYF | | 2.7 | 15/15 |

Suppl. Figure 5. TCRβ CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized Mamu-A*01+ rhesus monkey infected with SHIV-KB9. A. Post vaccination; B. Following infection with SHIV-KB9. PBMC were isolated from monkey AW13 after vaccination and day 141 following infection. Cells were cultured for 12-14 days in the presence of IL-2 with the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A or other variant p41A epitope peptides. RNA was isolated from sorted CD3+CD8+tetramer+ T cells and used to generate cDNA for CDR3 region sequencing. Highlighted sequences recognize more than one variant of p41A. Sequences in bold with frequencies in red were observed in at least two monkeys. Frequencies represent the number of clones with the noted CDR3 sequence / total number of sequenced clones.

Vβ 12.3

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS EFGGS YEQYF | 2.7 | 35/103 |
| | CASS EYGLS YEQYF | | 16/103 |
| | CASS EYVGS YEQYF | | 1/103 |
| | CASS EYVNSN YEQYF | | 1/103 |
| | CASS EYVGLS YKQYF | | 1/103 |
| | CASS EYVLS YKQYF | | 1/103 |
| | CASS EYVTEC YEQYF | | 1/103 |
| | CASS EYVTRG YEQYF | | 16/103 |
| | CASS EYVTRG GOYF | | 1/103 |
| | CASS EYVTRG YQYF | | 28/103 |
| CASS PLGGG ETQYF | 2/103 | | |
| CASS TLGGREN QYF | 1/103 | | |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS EFGGS YEQYF | 2.7 | 13/102 |
| | CASS EYGLS YEQYF | | 7/102 |
| | CASS PLGGG ETQYF | | 80/102 |
| | CASS NLLGGREN QYF | | 1/102 |
| Variant 3 YAPPI1GV1 | CASS EFGGS YEQYF | 2.1 | 1/102 |
| | CASS WGVTYN EQYF | | 1/102 |
| | CASS WGVTYN EQYF | | 2.1 |
| Variant 5 YAPPI5G1 | CASS EFGGS YEQYF | 2.7 | 100/109 |
| | CASS EFGGK YQYF | | 1/109 |
| | CASS EFGGS YKQYF | | 1/109 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS EFGGS YQYF | 2.3 | 1/109 |
| | CASS EFGGK YQYF | | 1/109 |
| | CASS EGNQ PQYF | | 3/109 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS EFGGS YEQYF | 2.7 | 19/108 |
| | CASS PLGGG ETQYF | | 79/108 |
| | CASS PLGGG ETQYF | | 1/108 |
| | CASS PLGGR ETQYF | | 1/108 |
| | CASS EYVTRG YEQYF | | 3/108 |
| | CASS EFGGK YQYF | | 1/108 |
| | CASS EYVTRG YKQYF | | 1/108 |
| | CASS EFGDS YEQYF | | 1/108 |
| | CASS EYVYQ YQYF | | 1/108 |
| | CASS LLGGREN QYF | | 1/108 |

Vβ 13A

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 6/101 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 2.1 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 52/101 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 16/101 |
| | CASS YVSSN EQYF | | 3/101 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 1.3 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 12/101 |
| | CASS YQGGNT VYF | | 1/101 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 1/101 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 1.4 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 2/111 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 2.1 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 23/111 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 65/111 |
| Variant 1 YAPPI1AGN1 | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 1/111 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 1.3 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 19/111 |
| Variant 3 YAPPI1GV1 | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 98/102 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 1.4 |
| | CASS YVGGNT VYF | | 4/102 |
| Variant 5 YAPPI5G1 | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 115/118 |
| | CASS SWGRR EAQYF | | 1/118 |
| | CASS EFGGS YQYF | | 1/118 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 1/111 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/111 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/111 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.1 | 56/101 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 1/101 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/111 |
| | CASS PLGGG ETQYF | | 1/111 |
| | CASS PPGPF EQYF | | 1/111 |
| | CASS EFTGT YQYF | | 1/111 |
| | CASS SWGRR EN YQYF | | 1/111 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 26/111 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 79/111 |
| | CASS HWYG EQYF | | 1/111 |

Vβ 13C1

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS EYSTS YEQYF | 2.7 | 31/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 18/106 |
| | CASS GGV YQYF | | 13/106 |
| | CASS YVGGN EQYF | | 1/106 |
| | CASS GYQNN QYF | | 2/106 |
| | CASS EYDRT YEQYF | | 13/106 |
| | CASS EYSTR YEQYF | | 1/106 |
| | CASS EYVGS YEQYF | | 2/106 |
| | CASS EYVTS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS EYSTN YEQYF | | 2/106 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS EYSTS YEQYF | 2.7 | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 1/106 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS EYSTS YEQYF | 2.7 | 11/114 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 11/114 |
| | CASS GGV YQYF | | 17/114 |
| | CASS YVGGN EQYF | | 1/114 |
| | CASS EYSTS YEQYF | | 2/114 |
| | CASS PLVGGAG YQYF | | 1/114 |
| | CASS EYVGS YEQYF | | 1/114 |
| | CASS EYVGS YEQYF | | 1/114 |
| | CASS GYQ NTQYF | | 2.4 |
| | CASS WGVTYN EQYF | | 2.1 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS EYSTS YEQYF | 2.7 | 7/102 |
| | CASS DWVGS YEQYF | | 48/102 |
| | CASS GGV YQYF | | 1/102 |
| | CASS EFTGT YQYF | | 1/102 |
| | CASS GYQ NTQYF | | 2.4 |
| | CASS WGVTYN EQYF | | 2.1 |
| | CASS WGVTYN EQYF | | 10/102 |
| | CASS WGVTYN EQYF | | 3/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1.6 |
| | CASS ELQGN SPLVF | | 2.3 |
| Variant 5 YAPPI5G1 | CASS ERNHRD SPLVF | 1.2 | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/102 |

Vβ 13C2

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS ERNHRD SPLVF | 1.6 | 2/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1.1 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 12/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1.4 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 8/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 15/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 2.7 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 19/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 13/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 3/114 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS ERNHRD SPLVF | 1.2 | 4/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/114 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS ERNHRD SPLVF | 1.6 | 2/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1.1 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 10/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1.4 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 4/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 2.7 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 2/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 33/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 6/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 6/112 |
| Variant 5 YAPPI5G1 | CASS ERNHRD SPLVF | 1.2 | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS ERNHRD SPLVF | 1.1 | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |
| | CASS ERNHRD SPLVF | | 1/112 |

B. Post-challenge

Vβ 12.3

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS EFGGS YEQYF | 2.7 | 84/136 |
| | CASS EFGGS YKQYF | | 1/136 |
| | CASS EFGGS YKQYF | | 1/136 |
| | CASS EYGLS YEQYF | | 5/136 |
| | CASS PLGGG ETQYF | | 4/136 |
| | CANS PLGGG ETQYF | | 1/136 |
| | CASS LWVGSY PQYF | | 2.3 |
| | CASS FTGDI EAFY | | 1.1 |
| | CASS EFGGS YEQYF | | 2.7 |
| | CASS EFGGS YEQYF | | 57/137 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS PFGGG ETQYF | 2.1 | 1/137 |
| | CATT PLGGG ETQYF | | 1/137 |
| | CASS EYVTRG YQYF | | 1/137 |
| | CASS EYGLS YEQYF | | 1/137 |
| Variant 5 YAPPI5G1 | CASS EFGGS YEQYF | 2.7 | 2/137 |
| | CASS EFGGS YEQYF | | 149/149 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS EFGGS YQYF | 2.7 | 88/116 |
| | CASS EFGGS YKQYF | | 2/116 |
| | CASS PLGGG ETQYF | | 28/116 |

Vβ 13A

| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequences Vβ Dβ Jβ | Jβ gene family | Frequency |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|-----------|
| 89.6P-p41A YAPPI1GQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 9/97 |
| | CASS LRGLGPEQ ETQYF | | 2.1 |
| | CASS LRGLGPEQ ETQYF | | 50/97 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 1/97 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 1/97 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 1/97 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 18/97 |
| | CASS YVSSG EQYF | | 1.2 |
| | CASS FRGG AQLFF | | 2.2 |
| | CASS QRDD OPOYF | | 1.5 |
| HxB2 YAPPI5GQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| | CASS SWGRR ETQYF | | 1/96 |
| Variant 1 YAPPI1AGN1 | CASS SWGRR ETQYF | 2.7 | 69/71 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 1.4 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| | CASS FGRGPTN EKLFY | | 2.1 |
| Variant 8 YAPPI1AGQI | CASS SWGRR ETQYF | 2.1 | 1/95 |
| | CASS FRTGT YEQYF | | 1/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 84/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 8/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 1/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 1/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 1/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 1/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 1/95 |
| | CASS YVGGV EQYF | | 1/95 |

Suppl. Figure 6. TCRβ CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkey infected with SHIV-KB9. A. Post vaccination ; B. Following infection with SHIV-KB9. PBMC were isolated from monkey AW2P after vaccination and day 141 following infection. Cells were cultured for 12-14 days in the presence of IL-2 with the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A, or other variant p41A epitope peptides. RNA was isolated from sorted CD3+CD8+tetramer+ T cells and used to generate cDNA for CDR3 region sequencing. Highlighted sequences recognize more than one variant of p41A. Sequences in bold in red were observed in at least two monkeys. Frequencies represent the number of clones with the noted CDR3 sequence / total number of sequenced clones.

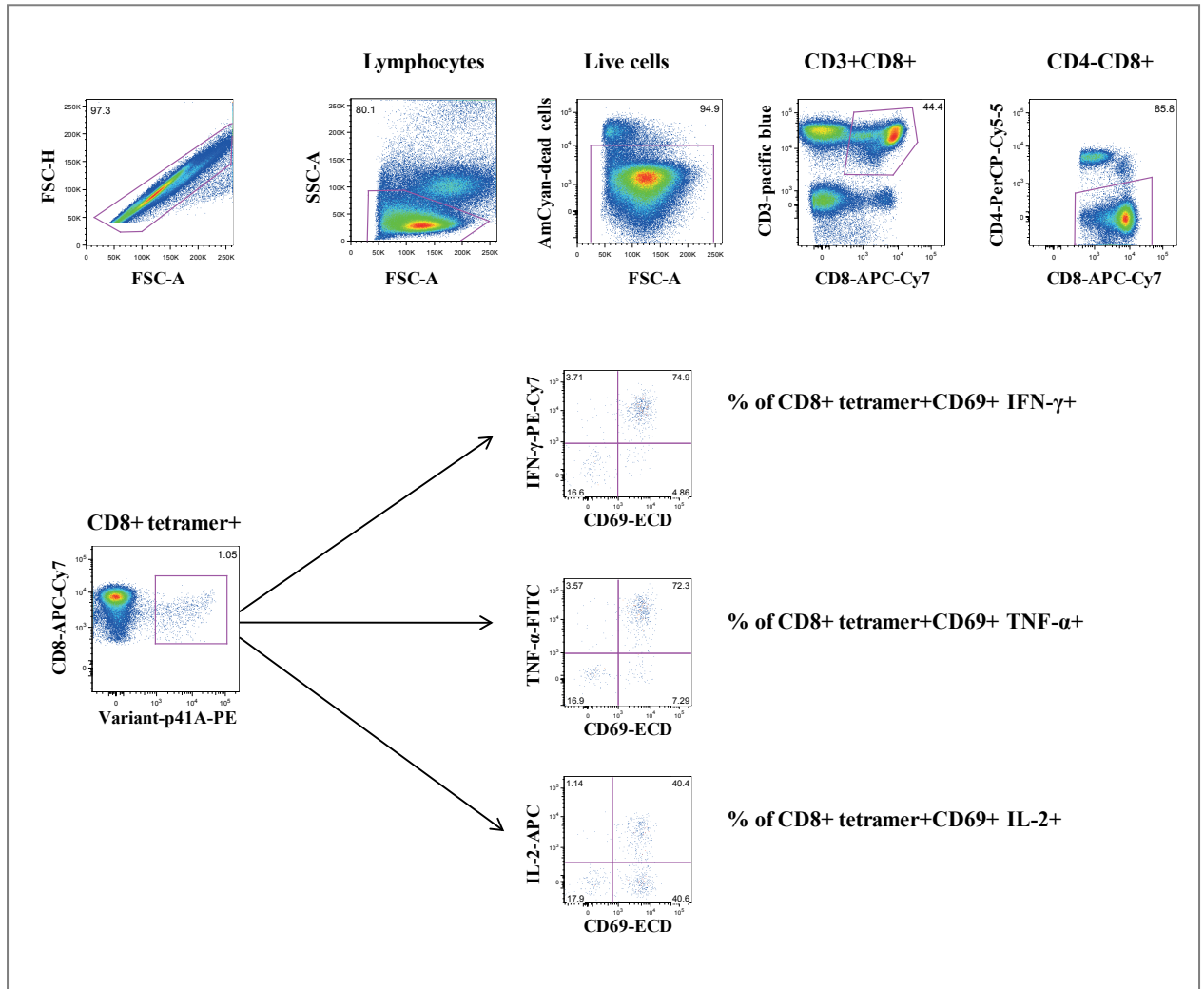
AV83

| Vβ 12.3 | | | | | | |
|----------------------------------|---------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|------|
| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequence | | | Jβ gene family | Frequency | |
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | |
| 89.6P-p41A YAPPIAGQI | CASS | EFTGT | YEQYF | 2.7 | 66/101 | |
| | CASS | EFGGI | YEQYF | | 34/101 | |
| | CASS | EFTGA | YEQYF | | 1/101 | |
| HxB2 YAPPISGQI | CASS | EFGGI | YEQYF | 2.7 | 38/93 | |
| | CASS | EGSS | YEQYF | | 37/93 | |
| | CASS | EFEFT | YEQYF | | 1/93 | |
| | CASS | RGETSSS | YEQYF | | 1/93 | |
| | CASS | RGGTSSS | YEQYF | | 1/93 | |
| | CASA | TTSLDGGWMSD | YEQYF | | 2/93 | |
| | CASA | TTALDGGWMSD | YEQYF | | 1/93 | |
| | CASS | EWSSYY | QYF | | 1/93 | |
| | CASS | EGSSYY | QYF | | 1/93 | |
| | CASS | DLWVG | POYF | | 2.3 | 2/93 |
| | CASR | LPGLG | EQFF | | 2.1 | 2/93 |
| | CASS | QGVGYN | EQFF | | 2/93 | |
| | CASR | FTGTGS | EQFF | | 1/93 | |
| | CASN | RGQVS | EKLFF | | 1.4 | 1/93 |
| | CARA | GGPNY | DYTF | | 1.2 | 2/93 |
| | Variant 5 YAPPISGRI | CASS | EFGGI | | YEQYF | 2.7 |
| CASS | | EPGTT | YKQYF | 1/151 | | |
| CASS | | ELGGT | YEQYF | 2/151 | | |
| CASN | | EPGGT | YEQYF | 1/151 | | |
| CAGS | | EPGGT | YEQYF | 1/151 | | |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CASS | EFGGI | YEQYF | 2.7 | 114/116 | |
| | CASS | GFGGT | YEQYF | | 1/116 | |
| CVSS | EPGGT | YEQYF | | 1/116 | | |

| Vβ 13A | | | | | | |
|----------------------------------|---------------|---------------|--------------|----------------|------------|------------|
| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequence | | | Jβ gene family | Frequency | |
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | |
| 89.6P-p41A YAPPIAGQI | CASS | YTGGMNT | EAFF | 1.1 | 4/4 | |
| HxB2 YAPPISGQI | CASS | EYGLL | YEQYF | 2.7 | 2/9 | |
| | CASS | SLGGI | YEQYF | | 1/9 | |
| | CASS | PDR | YQYF | | 1/9 | |
| | CASR | TWTGNSQ | NTQYF | | 2.4 | 2/9 |
| | CASW | AGQ | NTQYF | | 1/9 | |
| | CAS | PWGSSN | QPQYF | | 1.5 | 1/9 |
| CASS | EAARGVN | QPQYF | | 1/9 | | |
| Variant 1 YAPPIAGNI | CASS | EPGGT | YEQYF | 2.7 | 3/7 | |
| | CASS | DWTGGSQ | NTQYF | | 2.4 | 4/7 |
| Variant 5 YAPPISGRI | CASS | YWMRLQDT | AQLFF | 2.2 | 48/48 | |
| | | | | | | |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CASS | EPGGT | YEQYF | 2.7 | 3/8 | |
| | CASS | ITGTGPSTD | PQYF | | 2.3 | 5/8 |

| Vβ 13C2 | | | | | | | |
|----------------------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------|-------|---------------|
| Epitope-specific CTL populations | CDR3 sequence | | | Jβ gene family | Frequency | | |
| | Vβ | Dβ | Jβ | | | | |
| 89.6P-p41A YAPPIAGQI | CASS | VVGTGTGA | YEQYF | 2.7 | 21/98 | | |
| | CASS | VIGTGTGA | YEQYF | | 1/98 | | |
| | CASR | FTGS | YEQYF | | 13/98 | | |
| | CAS | FTGS | YEQYF | | 20/98 | | |
| | CASS | EYSGT | YEQYF | | 13/98 | | |
| | CASR | EYSGT | YEQYF | | 12/98 | | |
| | CASR | EYSGT | YEQYF | | 2/98 | | |
| | CAIR | FTGS | YEQYF | | 1/98 | | |
| | CASR | ITGS | YEQYF | | 1/98 | | |
| | CAS | SRGNT | ETQYF | | 2.5 | 1/98 | |
| | CASS | EYFSGN | YDITYF | | 1.2 | 6/98 | |
| | CASS | EGVDG | YDYTF | | 2/98 | | |
| | CASS | EVVAM | DYTF | | 1/98 | | |
| | CASR | RGN | EKLFF | | 1.4 | 1/98 | |
| | CASR | LSTN | EKLFF | | 1/98 | | |
| | CASS | ITGTGPSTD | PQYF | | 1.5 | 1/98 | |
| | CASS | EALRGSNT | EAFYF | | 1.1 | 1/98 | |
| | HxB2 YAPPISGQI | CASS | VVGTGTGA | | YEQYF | 2.7 | 29/135 |
| | | CASS | VIGTGTGA | | YEQYF | | 1/135 |
| CASR | | FTGS | YEQYF | 20/135 | | | |
| CAS | | FTGS | YEQYF | 16/135 | | | |
| CASS | | EYSGT | YEQYF | 22/135 | | | |
| CASR | | EYSGT | YEQYF | 11/135 | | | |
| CASS | | EYSKT | YEQYF | 3/135 | | | |
| CASS | | EYSET | YEQYF | 2/135 | | | |
| CASS | | ESSGT | YEQYF | 1/135 | | | |
| CASR | | EYNT | YEQYF | 1/135 | | | |
| CASR | | EYDIT | YEQYF | 2/135 | | | |
| CASR | | FTKS | YEQYF | 2/135 | | | |
| CAS | | FTES | YEQYF | 1/135 | | | |
| CASS | | EYSGT | YKQYF | 2/135 | | | |
| CASR | | EYSGT | YKQYF | 1/135 | | | |
| CASS | | EYFSGN | YDITYF | 1/135 | | | |
| CASS | | EYFSKN | YDITYF | 2/135 | | | |
| CASS | | EGVDG | YDYTF | 2/135 | | | |
| CASS | | EVVAM | DYTF | 4/135 | | | |
| CASR | | RGN | EKLFF | 7/135 | | | |
| CASR | TSGATN | EKLFF | 1/135 | | | | |
| CASS | ELSGRGGN | TWYF | 4/135 | | | | |
| Variant 1 YAPPIAGNI | CASS | VVGTGTGA | YEQYF | 2.7 | 18/126 | | |
| | CASS | VEGTGTGA | YEQYF | | 1/126 | | |
| | CASR | FTGS | YEQYF | | 82/126 | | |
| | CASS | EPGGT | YEQYF | | 4/126 | | |
| | CASR | EYSGT | YEQYF | | 4/126 | | |
| | CASS | DWTGGSQ | NTQYF | | 6/126 | | |
| | CASI | RRGSL | NTQYF | | 9/126 | | |
| | CATS | EASHHRQ | QPQYF | | 1.5 | 2/126 | |
| Variant 8 YAPPIAGQI | CASS | VVGTGTGA | YEQYF | 2.7 | 17/103 | | |
| | CASS | VVGTGTGA | YKQYF | | 1/103 | | |
| | CASS | VEGTGTGA | EQYF | | 1/103 | | |
| | CASR | RGN | EKLFF | | 1.4 | 1/103 | |
| | CASN | ITGTGPSTD | PQYF | | 1.5 | 1/103 | |
| CASS | ITGTGPSTD | PQYF | | 82/103 | | | |

Suppl. Figure 7. TCRβ CDR3 sequences in CD8+ T lymphocyte populations specific for p41A variants in 89.6P Env immunized *Mamu-A*01+* rhesus monkey infected with SHIV-KB9. PBMC were isolated from monkey AV83 day 141 following infection. Cells were cultured for 12-14 days in the presence of IL-2 with the 89.6P-p41A, the HxB2-p41A, or other variant p41A epitope peptides. RNA was isolated from sorted CD3⁺CD8⁺tetramer⁺ T cells and used to generate cDNA for CDR3 region sequencing. Highlighted sequences recognize more than one variant of p41A. Sequences in bold with frequencies in red were observed in at least two monkeys. Frequencies represent the number of clones with the noted CDR3 sequence / total number of sequenced clones.



Suppl. Figure 8. Gating strategy used to identify cytokine producing T cells interacting with tetramers constructed with variants of the p41A epitope peptide. The percentage of each boxed specific cell population is indicated. Doublets were excluded by forward-scatter area (FSC-A) versus FSC height (FSC-H). Dead cells were excluded by their staining with a fluorescent reactive dye.

DISCUSSION

La diversité du VIH-1 représente un énorme challenge dans la conception d'un vaccin qui serait efficace contre les diverses souches du virus et contre les formes mutantes émergentes capables d'échapper à la réponse immunitaire naturelle.

De nombreuses études ont démontré l'importance des lymphocytes T CD8⁺ dans le contrôle du VIH-1 et du VIS, mais peu ont caractérisé les populations de lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître diverses formes du virus.

Les travaux réalisés pendant ma thèse ont permis d'identifier et de caractériser des populations de lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître des variants d'un épitope de l'enveloppe du VIH-1. Ces populations de lymphocytes ont été générées par différentes vaccinations de singes rhésus Mamu-A01⁺ qui utilisaient l'enveloppe de diverses formes du VIH-1, et / ou élicitées après infection par SHIV. J'ai montré qu'une vaccination utilisant le clade C de l'enveloppe du VIH-1 comme immunogène est moins protectrice qu'une vaccination qui utilise le clade B de l'enveloppe, dans le sens où elle génère moins de lymphocytes T CD8⁺ cross-réactifs et qu'elle induit une réponse divergente chez des singes qui partagent le même CMH-I. D'autre part, l'analyse du V β répertoire de lymphocytes T CD8⁺ a montré que l'expression de certaines familles de gènes codant pour la chaîne β du TCR ne permet pas de perdre la capacité des lymphocytes T CD8⁺ à reconnaître des épitopes provenant de diverses formes du VIH-1. Ceci suggère que le séquençage des CDR3 du TCR β serait plus indiqué pour caractériser ces lymphocytes. Finalement, des tests fonctionnels ont démontré que si une même population de lymphocytes T CD8⁺ peut reconnaître diverses séquences peptidiques d'un même épitope, ces variants peptidiques ne présentent pas la même capacité à induire la synthèse de cytokines par les lymphocytes T CD8⁺ qui les reconnaissent. Ces études suggèrent donc que des populations de lymphocytes T CD8⁺ générées par la vaccination peuvent reconnaître

diverses formes d'un épitope viral mais ne produiraient pas la réponse optimale nécessaire pour conférer une protection contre les virus qui exprimeraient ces variants. Cette information est donc capitale dans le développement d'un vaccin efficace contre le VIH-1.

I. Cross-réactivité et protection contre le VIH-1

Les résultats de mes travaux de thèse sont en accord avec ceux de Seaman et al. réalisés sur la même cohorte de singes¹⁴⁸. Dans cette étude, l'activité des CTL a été mesurée par la production d'IFN- γ après stimulation de PBMC par des pools de peptides relatifs aux différents clades de l'enveloppe préalablement utilisés pour vacciner les singes et les infecter. Ces tests ont montré qu'une immunisation utilisant le clade B de l'enveloppe comme immunogène permet de générer de fortes réponses cellulaires contre des épitopes relatifs à l'immunogène et dans une moindre mesure contre des épitopes relatifs à d'autres sous-types du virus. La plus forte cross-réactivité a été observée pour les peptides relatifs aux deux clades B de l'enveloppe (89.6P et HxB2). La cross-réactivité est maximale quand l'immunogène et un variant de l'immunogène partagent un maximum de séquences communes. En fait, 81% des séquences d'acides aminés de l'enveloppe (HxB2 Env) sont identiques à ceux de l'enveloppe (89.6P Env) et 72% le sont avec le clade C de l'enveloppe (clade C Env)¹⁴⁸.

En marquant des PBMC avec des tétramères spécifiques de variants de p41A, j'ai montré que l'immunisation de singes rhésus par HxB2 Env permet d'éliciter des populations de lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître HxB2-p41A, l'épitope relatif à l'enveloppe de la forme virale utilisée comme immunogène. Ces expériences

ont également montré que ces lymphocytes étaient capables de reconnaître 89.6P-p41A, épitope relatif à l'enveloppe de la forme virale chimérique qui a été utilisée pour infecter les singes. Ces deux nonapeptides varient d'un acide aminé en position 6 (Cf. Table I, Article 1). De plus, j'ai montré que l'inverse était possible. En effet, la vaccination de singes rhésus par 89.6P Env a généré des lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître 89.6P-p41A et HxB2-p41A. Ces populations ont été caractérisées par l'évaluation de leur \mathcal{V} répertoire. L'analyse de l'expression de 46 familles et sous-familles de gènes codant pour la chaîne β variable du TCR a montré que la reconnaissance de ces 2 épitopes est réalisée par le même usage d'un large répertoire de $V\beta$. Ces données suggèrent que ces deux types d'immunisations génèrent une population de lymphocytes T CD8⁺ cross-réactifs qui utilisent un large répertoire de $V\beta$ pour reconnaître des variants d'un même épitope. Par ailleurs, la reconnaissance d'un troisième variant de p41A a été testée dans les mêmes conditions. Les résultats ont montré que l'immunisation par 89.6P Env permet de générer des lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître le clade C-p41A mais avec une magnitude bien moins importante que celle observée pour 89.6P-p41A et HxB2-p41. En fait, la séquence de cet épitope varie par deux acides aminés par rapport à celle de l'épitope relatif à l'immunogène. Des tests fonctionnels ont confirmé que les lymphocytes T capables de reconnaître 89.6P-p41A et HxB2-p41A présentaient de fortes réponses polyfonctionnelles. Cependant, ils ont montré que selon la nature de la substitution et la position dans la séquence peptidique de l'épitope, la reconnaissance de celui-ci par les lymphocytes T CD8⁺ n'induit pas une production de cytokines comparable à celle générée par la reconnaissance de l'immunogène. De plus, quand les variants peptidiques diffèrent par 2 acides aminés, leur reconnaissance par les mêmes lymphocytes T CD8⁺ diminue fortement et leur fonctionnalité est très altérée

voire quasi nulle. D'autres travaux montrent ce type de phénomène. Hoof et al. ont étudié la reconnaissance de 6 épitopes de Gag, Pol et Nef et de leur variants chez des patients infectés par le HIV-1. Ils ont montré que pour ces protéines, une substitution dans la séquence peptidique de l'épitope peut conduire à une baisse de la réponse fonctionnelle des lymphocytes T CD8+ impliqués dans la reconnaissance de ces variants. De plus, ils ont montré que pour ces épitopes, les substitutions d'acides aminés en position centrale des séquences peptidiques conduisaient à l'abrogation de la reconnaissance des lymphocytes T CD8+²⁵⁵. Bennetts et al. ont montré que la reconnaissance d'un épitope provenant de divers clades du VIH-1 par des lymphocytes T CD8+ ne reflète pas leur activité contre ces différentes formes du virus²⁵⁶. La variabilité des séquences d'un épitope est donc un facteur crucial à prendre en compte dans le choix des immunogènes dans un vaccin. Ces résultats constituent un argument de plus au développement de stratégies vaccinales qui impliquent plusieurs immunogènes provenant de différentes formes du VIH-1 (vaccin multiclade¹⁴⁸) comme celui testé dans des essais cliniques en phase II par le NIAID et le VRC (Cf. Introduction, Table II) ou des vaccins de type "mosaïque"^{254,257} (Cf. Introduction, V.2).

Un certain nombre de travaux suggèrent qu'une meilleure protection serait liée à la "qualité" des lymphocytes T CD8+ (diversité du répertoire, clonotypes publics, polyfonctionnalité)^{194,204,258,259}. Dans mes travaux, j'ai exploré la clonalité des différentes populations de lymphocytes T CD8+ reconnaissant divers variants de p41A en analysant leur V β répertoire et le séquençage des CDR3 du TCR β .

II. L'analyse du V β répertoire

J'ai utilisé des amorces spécifiques de 46 familles et sous-familles de gènes codant pour la chaîne β du TCR pour évaluer le répertoire d'une population de lymphocytes T CD8⁺. Cette technique était couramment utilisée dans mon laboratoire pour caractériser des populations de lymphocytes T capables de reconnaître différents épitopes du VIH-1 ou du VIS^{173,183,189}. Cependant, cette méthode induit un biais dans l'évaluation du V β répertoire des lymphocytes T CD8⁺ dans le sens où elle mesure l'expression d'un nombre "restreint" de familles de gènes. En 2007, le génome du singe rhésus macaque est séquencé. L'année suivante, Greenaway et al. ont publié des travaux réalisés à partir de ces séquences dans le but de caractériser l'ensemble des gènes codant pour la chaîne β du TCR²⁶⁰. Ils ont identifié les gènes homologues codant pour la chaîne β du TCR chez l'humain et ont proposé d'utiliser ces différents gènes comme standards pour évaluer le V β répertoire spécifique d'une population de lymphocytes T CD8⁺.

A partir de l'ADNc obtenu par transcription inverse des ARN isolés de la population de lymphocytes T CD8⁺ étudiée, l'amplification des séquences codant pour le CDR3 du TCR β peut être réalisée avec une amorce universelle et une amorce spécifique de la chaîne constante du TCR comme précédemment décrit^{195,261}. Le séquençage et la comparaison de ces séquences avec celles répertoriées par Greenaway permet de retrouver les gènes Vb constitutifs du V β répertoire de cette population de lymphocytes. Cette méthode permet de clonotyper les lymphocytes T CD8⁺ et d'évaluer le V β répertoire de ces lymphocytes "en une seule étape", et sans limiter l'analyse à un nombre précis de gènes Vb.

III. Rôle des clonotypes publics

Le séquençage de 8112 séquences CDR3 du TCR β n'a pas permis de mettre clairement en évidence le rôle de clonotypes publics dans la protection des singes contre SHIV comme le suggéraient les travaux de Price et al.²⁰⁴. En effet, dans le groupe de singes non vaccinés et infectés par SHIV, la plupart des clonotypes impliqués dans la reconnaissance de variants de p41A sont publics. Or, 5 semaines après infection, dans ce groupe de singes non vaccinés infectés par SHIV, le nombre de copies d'ARN viral/ml de plasma était significativement supérieur à celui observé dans le groupe des singes vaccinés et infectés. Chez ces derniers le virus était non détectable dès la 9ème semaine après infection, alors que la charge virale était de 6000 à 10000 copies /ml de plasma chez les singes non vaccinés (Manuel, données non publiées). Dans le but d'identifier les clonotypes qui conféreraient une meilleure protection contre le virus, j'ai comparé les clonotypes publics observés dans ces deux groupes de singes (Figure 32). L'analyse des 8112 séquences de CDR3 du TCR β chez 6 singes a permis d'identifier 20 clonotypes publics : 9 sont présents seulement dans le groupe de singes vaccinés et infectés, 9 autres ont été observés dans les deux groupes de singes et 2 ne sont observés que dans le groupe de singes non vaccinés et infectés. Ces résultats montrent que 18/20 clonotypes publics sont présents dans le groupe de vaccinés et suggèrent que le contrôle du virus impliquerait les 9 clonotypes observés seulement chez les singes vaccinés et infectés. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait répéter cette analyse avec plus de singes, en séquençant les CDR3 avec la méthode utilisée notamment par Price et Sircar^{204,261}. Cette méthode n'induit pas de biais dû à l'utilisation d'amorces spécifiques aux gènes V β majoritairement représentées dans le V β répertoire de la population de lymphocytes T CD8+ étudiée.

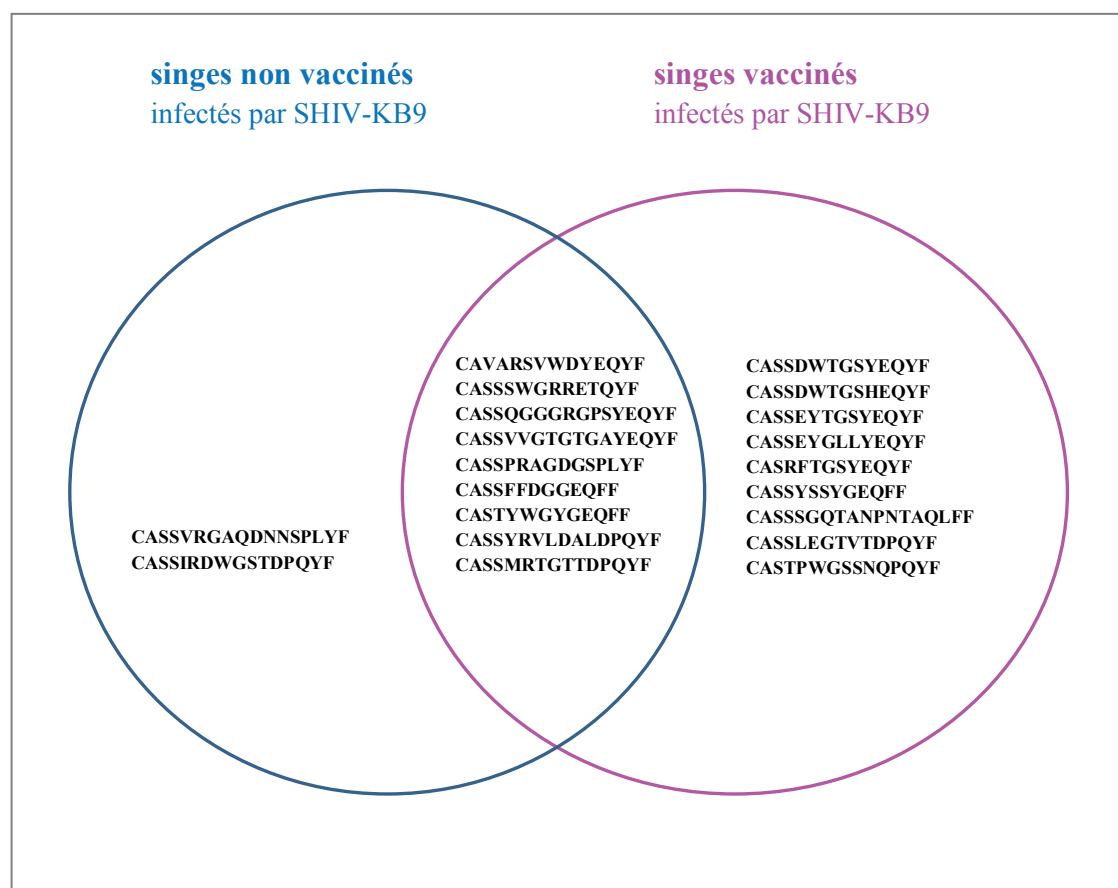


Figure 32 : Comparaison des clonotypes publics observés dans les différents groupes de singes.

En fait, la protection des singes vaccinés peut être conférée par l'activité de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'autres épitopes. En effet, les singes ont été immunisés avec d'autres séquences immunogéniques en plus de celles relatives à l'enveloppe du VIH-1, notamment des séquences de Gag et Nef. Dans l'étude de Santra et al., la production d'IFN- γ a été mesurée par ELISpot après exposition de PBMC à des pools de peptides qui couvrent les protéines Gag du VISmac251 et 89.6P Env du VIH-1, et aussi après stimulation par des épitopes nonamériques relatifs à ces protéines (soient p11C pour Gag du VIS et p41A pour Env du VIH-1). Les réponses contre p11C et p41A ont été évaluées également par des marquages utilisant des tétramères construits avec ces épitopes. Les deux singes immunisés via l'ADN

plasmidique ont montré de très fortes réponses contre Gag et Env et contre les épitopes spécifiques de ces deux protéines, respectivement p11C et p41A. De plus, les auteurs ont montré que ces réponses étaient stables, toujours détectables 150 semaines après la première immunisation¹³².

IV. Plasticité du TCR

La comparaison de mes travaux sur la clonalité de lymphocytes T CD8+ générés par différents types de vaccinations et de ceux réalisés par Sircar et al. et Cale et al. a permis de faire une observation intéressante. Sircar et al. ont caractérisé des lymphocytes T CD8+ isolés de différents compartiments (duodénum, colon et sang périphérique) de singes infectés par le VIS, et spécifiques de p11C connu comme un épitope dominant²⁶¹. Cale et al. ont caractérisé des lymphocytes T CD8+ capables de reconnaître des variants d'un épitope de Nef, p199RY, chez des singes infectés par le VIS où un phénomène d'échappement du virus à été observé (manuscrit en préparation).

Ces deux études et la mienne basées sur le séquençage des CDR3 du TCR β , ont mis en évidence la présence de clonotypes communs capables de reconnaître différents épitopes relatifs à l'enveloppe du VIH-1 mais aussi de Gag et Nef du VIS. Ceci souligne la plasticité des lymphocytes T CD8+ (Figure 33).

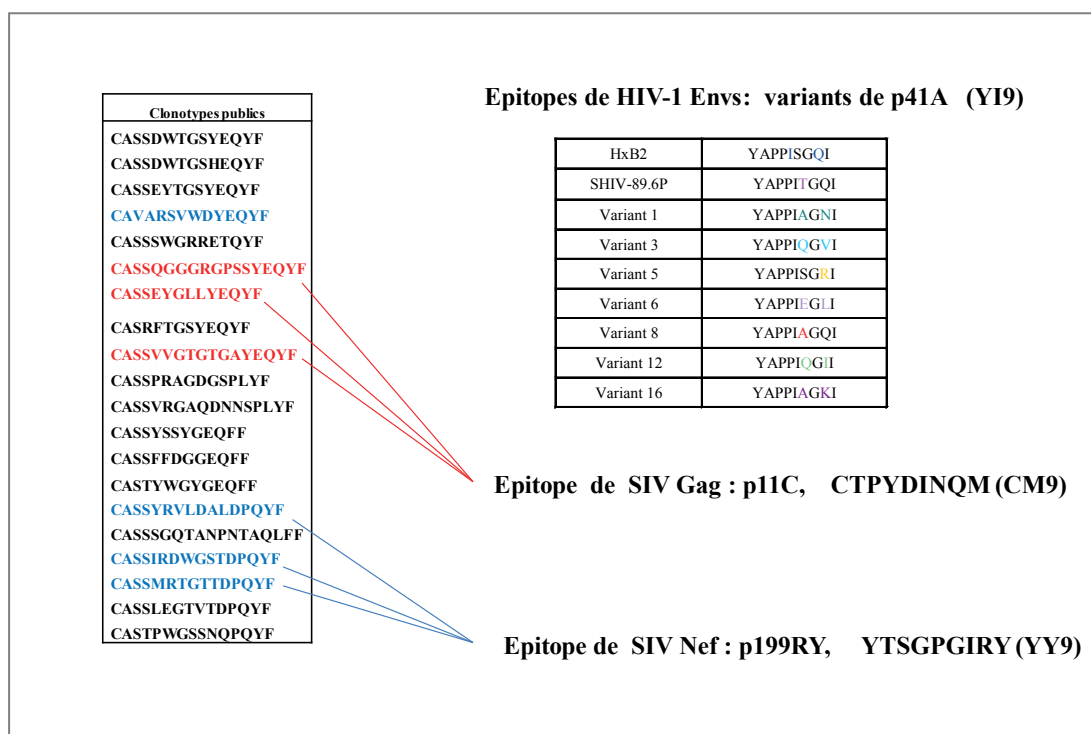


Figure 33 : Clonotypes publics capables de reconnaître p41A (Env), p11C (Gag), p199RY (Nef). Les 20 clonotypes publics identifiés dans mon étude sont listés dans le tableau de gauche. Les clonotypes en rouges ont été identifiés par Sircar et al.²⁶¹; ils sont capables de reconnaître p11C ainsi que p41A et ses variants listés dans la table de droite. Les clonotypes en bleu identifiés par Cale et al. (Manuscrit en préparation) sont capables de reconnaître p199RY ainsi que p41A et ses variants.

Nos différentes études ne permettent pas d'affirmer que la réponse immunitaire observée est essentiellement liée à la présence des clonotypes identifiés. Cependant, selon l'épitope reconnu, la réponse des lymphocytes T CD8⁺ est différente. La reconnaissance de p11C est connue comme induisant de fortes réponses des lymphocytes T associées à un bon pronostic. La reconnaissance de variants p199RY ne parvient pas à générer une réponse fonctionnelle des lymphocytes T CD8⁺ suffisante pour éviter l'échappement du virus. Finalement, les variants de p41A n'induisent pas une production de cytokines par les lymphocytes T CD8⁺ qui les reconnaissent, comparable à celle générée par la reconnaissance de l'immunogène.

Les tests fonctionnels sont donc une étape indispensable dans l'évaluation de la qualité des lymphocytes T CD8+ générés par la vaccination.

V. Avidité du TCR

Mes travaux ont montré que les différences dans la capacité des variants peptidiques d'un épitope à induire la production de cytokines par les lymphocytes T CD8+ ne sont pas dues à leur affinité pour la molécule du CMH-I. En effet, tous ces variants testés pour leur capacité à se lier à Mamu-A*01 présentaient des IC₅₀ comparables (Figure 1B, article 2). Ces différences sembleraient davantage liées à l'interaction entre le complexe CMH-I/épitope/β2m et le TCR des lymphocytes T CD8+. L'avidité fonctionnelle des lymphocytes T CD8+ est considérée par Almeida et al. comme la mesure de l'efficacité de la reconnaissance de l'antigène par ces lymphocytes²¹⁶. La Gruta et al. ont montré que la qualité de la réponse des lymphocytes T CD8+ mesurée par la production de cytokines est augmentée quand les lymphocytes T CD8+ ont une forte avidité²⁶². D'autres études ont montré que les lymphocytes T CD8+ à forte avidité induisent plus rapidement la mort des cellules infectées que les lymphocytes CD8+ à faible avidité^{263,264}. Les travaux d'Almeida et al. ont démontré qu'un meilleur contrôle de la réplication du VIH-1 par les lymphocytes T CD8+ était le reflet de leur avidité²¹⁶. L'efficacité avec laquelle les lymphocytes CD8+ sont stimulés et exercent leur effets antiviraux pour éradiquer le VIH-1 est donc dépendante de leur avidité.

VI. Autres acteurs de la réponse immunitaire

Santra et al. ont mis en évidence la présence de CD4⁺ fonctionnels chez les singes dont j'ai évalué la réponse des lymphocytes T CD8⁺¹³². Le nombre de lymphocytes T CD4⁺ après infection par SHIV est significativement différent entre les singes vaccinés et les singes non vaccinés (Manuel, données non publiées). Cinq semaines après infection, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ chez les singes non vaccinés est en moyenne 5 fois plus faible que celui observé chez les singes vaccinés et cet écart est maintenu 20 semaines après infection.

L'ensemble des réponses observées dans les différentes études citées ci-dessus et mon travail de thèse sont en accord avec l'état de santé des singes vaccinés qui contrôlent toujours le virus 3 ans après infection.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La conception d'un vaccin efficace contre le VIH-1 reste un objectif important et une étape décisive dans la lutte contre le SIDA.

Les tests de différents types d'immunisations ont conduit à beaucoup de déceptions notamment à la suite des résultats de l'étude STEP qui a conclu à l'échec du vaccin testé par Merck dans la protection contre le VIH-1^{57,265-269}. Cependant, même si l'étude RV144 montre que le vaccin testé confère une protection modeste contre le virus, elle a redonné espoir à la communauté scientifique qui tente de trouver un moyen efficace pour lutter contre ce virus²⁷⁰⁻²⁷⁵. Elle confirme que la combinaison de différents types d'immunisations peut avoir un effet protecteur.

Beaucoup d'éléments, d'acteurs et de mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire contre le VIH-1 restent à déterminer. La pathogénèse du VIH-1 implique en effet énormément de facteurs (Figure 34) et aucune piste ne doit être négligée.

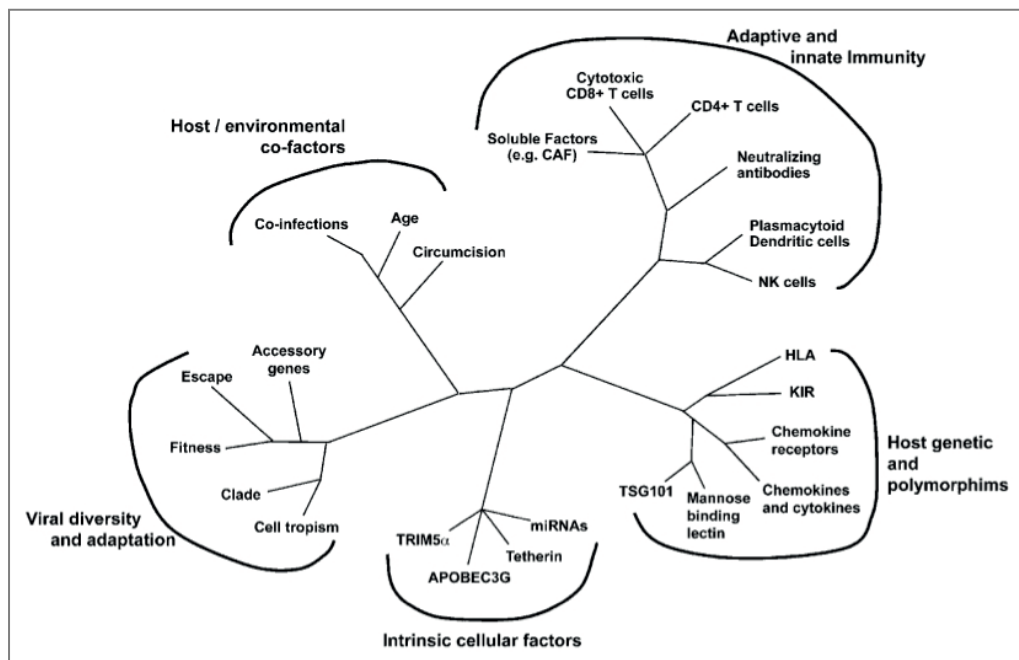


Figure 34: Réseau complexe de la pathogénèse des VIH et VIS (Appay 2009)⁴⁹

Toutes les études déjà réalisées dans le modèle simien ont déjà permis de répondre à bon nombre de questions sur la pathogenèse des VIH-1 et VIS, et permettent de tester des traitements et des vaccins contre le VIH-1^{178,276}. Par ailleurs, un grand nombre d'informations peut être obtenu en étudiant l'immunité des individus naturellement protégés du VIH-1 comme les LTNP et les HEPS^{24,277,278}. C'est l'ensemble de ces recherches réalisables grâce aux collaborations internationales qui aboutira au contrôle du VIH-1. Enfin, le développement de programmes de prévention est aussi essentiel dans la lutte contre le SIDA. Il vaut toujours mieux prévenir que guérir.

REFERENCES

1. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30, 250-2 (1981).
2. Gottlieb, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305, 1425-31 (1981).
3. Barre-Sinoussi, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-71 (1983).
4. Barre-Sinoussi, F. HIV: a discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5809-14 (2009).
5. Brun-Vezinet, F. et al. Detection of IgG antibodies to lymphadenopathy-associated virus in patients with AIDS or lymphadenopathy syndrome. *Lancet* 1, 1253-6 (1984).
6. Gallo, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 500-3 (1984).
7. Levy, J. A. et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225, 840-2 (1984).
8. Clavel, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-6 (1986).
9. Greene, W. C. & Peterlin, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8, 673-80 (2002).
10. Peterlin, B. M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3, 97-107 (2003).
11. Gotte, M., Li, X. & Wainberg, M. A. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* 365, 199-210 (1999).
12. Coffin, J. M. HIV viral dynamics. *Aids* 10 Suppl 3, S75-84 (1996).
13. McDougal, J. S. et al. Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping, antibody inhibition, and potential for idiotypic mimicry. *J Immunol* 137, 2937-44 (1986).
14. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9, 853-60 (2003).
15. Dragic, T. et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-73 (1996).
16. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-7 (1996).
17. Letvin, N. L. in *Fundamental Immunology* (ed. Paul, W. E.) 1204-1232 (Lippincott Williams & Wilkins, 2008).
18. Berger, E. A., Murphy, P. M. & Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17, 657-700 (1999).
19. Deng, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-6 (1996).
20. Bleul, C. C. et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-33 (1996).

21. Champagne, P., Lavoie, P. M., Sekaly, R. P. & Yachou, A. L'infection par le VIH: importance des facteurs de l'hôte. *Médecine sciences* 14, 142-147 (1998).
22. Hoffman, N. G., Seillier-Moiseiwitsch, F., Ahn, J., Walker, J. M. & Swanstrom, R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 76, 3852-64 (2002).
23. Tersmette, M. et al. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 62, 2026-32 (1988).
24. Levy, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *Aids* 23, 147-60 (2009).
25. Bounou, S., Leclerc, J. E. & Tremblay, M. J. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol* 76, 1004-14 (2002).
26. Arthos, J. et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 9, 301-9 (2008).
27. Karageorgos, L., Li, P. & Burrell, C. Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 817-23 (1993).
28. Cullen, B. R. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249, 203-10 (1998).
29. Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. A. & Holmes, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 5, 52-61 (2004).
30. Robertson, D. L., Sharp, P. M., McCutchan, F. E. & Hahn, B. H. Recombination in HIV-1. *Nature* 374, 124-6 (1995).
31. Letvin, N. L. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol* 6, 930-9 (2006).
32. Brun-Vezinet, F., Damond, F. & Simon, F. [Variability of human immunodeficiency virus type 1]. *Bull Soc Pathol Exot* 92, 261-3 (1999).
33. Robertson, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288, 55-6 (2000).
34. Couturier, E. et al. HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network. *Aids* 14, 289-96 (2000).
35. Charneau, P. et al. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205, 247-53 (1994).
36. Gao, M. et al. Difference in susceptibility to CC-chemokines among HIV-1 isolates. *Int J STD AIDS* 9, 471-5 (1998).
37. Simon, F. et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4, 1032-7 (1998).
38. Thomson, M. M., Perez-Alvarez, L. & Najera, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2, 461-71 (2002).
39. Korber, B. T., Allen, E. E., Farmer, A. D. & Myers, G. L. Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *Aids* 9 Suppl A, S5-18 (1995).

40. Gao, F. et al. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72, 5680-98 (1998).
41. Korber, B. T., Letvin, N. L. & Haynes, B. F. T-cell vaccine strategies for human immunodeficiency virus, the virus with a thousand faces. *J Virol* 83, 8300-14 (2009).
42. Osmanov, S., Pattou, C., Walker, N., Schwardlander, B. & Esparza, J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29, 184-90 (2002).
43. Spira, S., Wainberg, M. A., Loemba, H., Turner, D. & Brenner, B. G. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 51, 229-40 (2003).
44. Buonaguro, L., Tornesello, M. L. & Buonaguro, F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* 81, 10209-19 (2007).
45. Smith, D. K. et al. Antiretroviral postexposure prophylaxis after sexual, injection-drug use, or other nonoccupational exposure to HIV in the United States: recommendations from the U.S. Department of Health and Human Services. *MMWR Recomm Rep* 54, 1-20 (2005).
46. Chitwood, D. D. et al. HIV seropositivity of needles from shooting galleries in south Florida. *Am J Public Health* 80, 150-2 (1990).
47. Coovadia, H. Antiretroviral agents--how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS. *N Engl J Med* 351, 289-92 (2004).
48. Fauci, A. S., Pantaleo, G., Stanley, S. & Weissman, D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 124, 654-63 (1996).
49. Appay, V. 25 years of HIV research! ... and what about a vaccine? *Eur J Immunol* 39, 1999-2003 (2009).
50. Veazey, R. S. et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280, 427-31 (1998).
51. Potter, S. J. et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol* 81, 13904-15 (2007).
52. Fauci, A. S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 262, 1011-8 (1993).
53. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 41, 1-19 (1992).
54. Pantaleo, G. et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 332, 209-16 (1995).
55. Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrin, J. & Ho, D. D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 332, 201-8 (1995).
56. Shearer, G. M. & Clerici, M. Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us? *Immunol Today* 17, 21-4 (1996).
57. Walker, B. D. & Burton, D. R. Toward an AIDS vaccine. *Science* 320, 760-4 (2008).
58. Fust, G. et al. The complement system in HIV disease. *Immunol Invest* 20, 231-41 (1991).

59. Mangano, A. et al. Detrimental effects of mannose-binding lectin (MBL2) promoter genotype XA/XA on HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *J Infect Dis* 198, 694-700 (2008).
60. Ahmad, R. et al. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. *J Clin Immunol* 21, 227-33 (2001).
61. Martin, M. P. et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39, 733-40 (2007).
62. Alter, G. et al. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 195, 1452-60 (2007).
63. Borrow, P. & Bhardwaj, N. Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS* 3, 36-44 (2008).
64. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52 (1998).
65. Montefiori, D. in *Retroviral Immunology: immune response and restoration* (eds. Pantaleo, G. & Walker, B. D.) 191-211 (Humana Press, 2001).
66. Schmitz, J. E. et al. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol* 77, 2165-73 (2003).
67. Wei, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307-12 (2003).
68. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4144-9 (2003).
69. McMichael, A. J. & Rowland-Jones, S. L. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410, 980-7 (2001).
70. Rosenberg, E. S. et al. Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278, 1447-50 (1997).
71. Kalams, S. A. et al. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 73, 6715-20 (1999).
72. Levy, J. A. The search for the CD8⁺ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 24, 628-32 (2003).
73. Walker, B. D. et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328, 345-8 (1987).
74. Carmichael, A., Jin, X., Sissons, P. & Borysiewicz, L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med* 177, 249-56 (1993).
75. Wilson, J. D. et al. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *Aids* 14, 225-33 (2000).
76. Fu, T. M. et al. Evaluation of cellular immune responses in subjects chronically infected with HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23, 67-76 (2007).
77. Ogg, G. S. et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279, 2103-6 (1998).
78. Koup, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68, 4650-5 (1994).

79. Musey, L. et al. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 337, 1267-74 (1997).
80. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. & Levy, J. A. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234, 1563-6 (1986).
81. Kannagi, M., Chalifoux, L. V., Lord, C. I. & Letvin, N. L. Suppression of simian immunodeficiency virus replication in vitro by CD8+ lymphocytes. *J Immunol* 140, 2237-42 (1988).
82. Cocchi, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-5 (1995).
83. Kuroda, M. J. et al. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* 162, 5127-33 (1999).
84. Schmitz, J. E. et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857-60 (1999).
85. Jin, X. et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189, 991-8 (1999).
86. Letvin, N. L. & Walker, B. D. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 9, 861-6 (2003).
87. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. & Oldstone, M. B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68, 6103-10 (1994).
88. Allen, T. M. et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407, 386-90 (2000).
89. Goulder, P. J. et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 3, 212-7 (1997).
90. Barouch, D. H. et al. Dynamic immune responses maintain cytotoxic T lymphocyte epitope mutations in transmitted simian immunodeficiency virus variants. *Nat Immunol* 6, 247-52 (2005).
91. Phillips, R. E. et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354, 453-9 (1991).
92. Koenig, S. et al. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1, 330-6 (1995).
93. Borrow, P. et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3, 205-11 (1997).
94. Price, D. A. et al. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1890-5 (1997).
95. O'Connor, D. H. et al. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 8, 493-9 (2002).

96. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10, 11-23.
97. Weller, I. V. & Williams, I. G. ABC of AIDS. Antiretroviral drugs. *Bmj* 322, 1410-2 (2001).
98. Riordan, A. & Bugembe, T. Update on antiretroviral therapy. *Arch Dis Child* 94, 70-4 (2009).
99. Palella, F. J., Jr. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338, 853-60 (1998).
100. Siliciano, J. D. et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9, 727-8 (2003).
101. Lundgren, J. D. et al. Inferior clinical outcome of the CD4+ cell count-guided antiretroviral treatment interruption strategy in the SMART study: role of CD4+ Cell counts and HIV RNA levels during follow-up. *J Infect Dis* 197, 1145-55 (2008).
102. Burman, W. et al. Episodic antiretroviral therapy increases HIV transmission risk compared with continuous therapy: results of a randomized controlled trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49, 142-50 (2008).
103. Girard, M. P. & Verrier, B. Vaccins préventifs anti-VIH/sida. *Virologie* 10, 193-206 (2006).
104. Ross, A. L., Brave, A., Scarlatti, G., Manrique, A. & Buonaguro, L. Progress towards development of an HIV vaccine: report of the AIDS Vaccine 2009 Conference. *Lancet Infect Dis* 10, 305-16.
105. Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K. & Desrosiers, R. C. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258, 1938-41 (1992).
106. Stahl-Hennig, C. et al. Attenuated SIV imparts immunity to challenge with pathogenic spleen-derived SIV but cannot prevent repair of the nef deletion. *Immunol Lett* 51, 129-35 (1996).
107. Stahl-Hennig, C. et al. Rapid development of vaccine protection in macaques by live-attenuated simian immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 77 (Pt 12), 2969-81 (1996).
108. Baba, T. W. et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med* 5, 194-203 (1999).
109. Baba, T. W. et al. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* 267, 1820-5 (1995).
110. Chakrabarti, L. A. et al. A truncated form of Nef selected during pathogenic reversion of simian immunodeficiency virus SIVmac239Deltanef increases viral replication. *J Virol* 77, 1245-56 (2003).
111. Keefer, M. C. et al. Studies of high doses of a human immunodeficiency virus type 1 recombinant glycoprotein 160 candidate vaccine in HIV type 1-seronegative humans. The AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 1713-23 (1994).
112. Markel, H. The search for effective HIV vaccines. *N Engl J Med* 353, 753-7 (2005).
113. McMichael, A. J. & Hanke, T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med* 9, 874-80 (2003).
114. Cohen, J. Public health. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. *Science* 299, 1290-1 (2003).

115. Brander, C., Corradin, G., Hasler, T. & Pichler, W. J. Peptide immunization in humans: a combined CD8⁺/CD4⁺ T cell-targeted vaccine restimulates the memory CD4 T cell response but fails to induce cytotoxic T lymphocytes (CTL). *Clin Exp Immunol* 105, 18-25 (1996).
116. MacGregor, R. R. et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 178, 92-100 (1998).
117. Lewis, P. J. & Babiuk, L. A. DNA vaccines: a review. *Adv Virus Res* 54, 129-88 (1999).
118. Giri, M., Ugen, K. E. & Weiner, D. B. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin Microbiol Rev* 17, 370-89 (2004).
119. Baltimore, D. Steering a course to an AIDS vaccine. *Science* 296, 2297 (2002).
120. Letvin, N. L. Progress toward an HIV vaccine. *Annu Rev Med* 56, 213-23 (2005).
121. Barouch, D. H. Rational design of gene-based vaccines. *J Pathol* 208, 283-9 (2006).
122. Ramshaw, I. A. & Ramsay, A. J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21, 163-5 (2000).
123. Amara, R. R. & Robinson, H. L. A new generation of HIV vaccines. *Trends Mol Med* 8, 489-95 (2002).
124. Casimiro, D. R. et al. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 77, 6305-13 (2003).
125. Amara, R. R. et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69-74 (2001).
126. Im, E. J. & Hanke, T. MVA as a vector for vaccines against HIV-1. *Expert Rev Vaccines* 3, S89-97 (2004).
127. Shiver, J. W. et al. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415, 331-5 (2002).
128. Shiver, J. W. & Emini, E. A. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu Rev Med* 55, 355-72 (2004).
129. Doria-Rose, N. A. et al. Multigene DNA priming-boosting vaccines protect macaques from acute CD4⁺-T-cell depletion after simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P mucosal challenge. *J Virol* 77, 11563-77 (2003).
130. Subbramanian, R. A. et al. Magnitude and diversity of cytotoxic-T-lymphocyte responses elicited by multiepitope DNA vaccination in rhesus monkeys. *J Virol* 77, 10113-8 (2003).
131. Letvin, N. L. et al. Heterologous envelope immunogens contribute to AIDS vaccine protection in rhesus monkeys. *J Virol* 78, 7490-7 (2004).
132. Santra, S. et al. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J Virol* 79, 6516-22 (2005).
133. Amara, R. R. et al. A combination DNA and attenuated simian immunodeficiency virus vaccine strategy provides enhanced protection from

- simian/human immunodeficiency virus-induced disease. *J Virol* 79, 15356-67 (2005).
134. Cohen, J. Disappointing data scuttle plans for large-scale AIDS vaccine trial. *Science* 295, 1616-7 (2002).
135. Burton, D. R. et al. Public health. A sound rationale needed for phase III HIV-1 vaccine trials. *Science* 303, 316 (2004).
136. Cohen, J. Public health. AIDS vaccine still alive as booster after second failure in Thailand. *Science* 302, 1309-10 (2003).
137. Robinson, H. L. New hope for an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol* 2, 239-50 (2002).
138. Martinon, F. et al. Improved protection against simian immunodeficiency virus mucosal challenge in macaques primed with a DNA vaccine and boosted with the recombinant modified vaccinia virus Ankara and recombinant Semliki Forest virus. *Vaccine* 26, 532-45 (2008).
139. Nwanegbo, E. et al. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 351-7 (2004).
140. Barouch, D. H. et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 290, 486-92 (2000).
141. Autran, B. & Letvin, N. L. HIV epitopes recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Aids* 5 Suppl 2, S145-50 (1991).
142. Egan, M. A. et al. Use of major histocompatibility complex class I/peptide/beta2M tetramers to quantitate CD8(+) cytotoxic T lymphocytes specific for dominant and nondominant viral epitopes in simian-human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Virol* 73, 5466-72 (1999).
143. Charini, W. A. et al. Clonally diverse CTL response to a dominant viral epitope recognizes potential epitope variants. *J Immunol* 167, 4996-5003 (2001).
144. Barouch, D. H. et al. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 415, 335-9 (2002).
145. Villefroy, P. et al. SIV escape mutants in rhesus macaques vaccinated with NEF-derived lipopeptides and challenged with pathogenic SIVmac251. *Virol J* 3, 65 (2006).
146. Barouch, D. H. & Letvin, N. L. HIV escape from cytotoxic T lymphocytes: a potential hurdle for vaccines? *Lancet* 364, 10-1 (2004).
147. O'Connor, D. H., Allen, T. M. & Watkins, D. I. Cytotoxic T-lymphocyte escape monitoring in simian immunodeficiency virus vaccine challenge studies. *DNA Cell Biol* 21, 659-64 (2002).
148. Seaman, M. S. et al. Multiclade human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *J Virol* 79, 2956-63 (2005).
149. Fischer, W. et al. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med* 13, 100-6 (2007).
150. Gaschen, B. et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* 296, 2354-60 (2002).
151. Nickle, D. C. et al. Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science* 299, 1515-8; author reply 1515-8 (2003).
152. Gao, F. et al. Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity. *Expert Rev Vaccines* 3, S161-8 (2004).

153. Gao, F. et al. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol* 79, 1154-63 (2005).
154. McDermott, A. & Cohen, P. Researchers take a measured response. Immunologists compare data and techniques at Measurement of Antigen-Specific Immune Response conference. *IAVI Rep* 9, 1-5 (2004).
155. McMichael, A., Mwau, M. & Hanke, T. Design and tests of an HIV vaccine. *Br Med Bull* 62, 87-98 (2002).
156. Newberg, M. H. et al. A simian immunodeficiency virus nef peptide is a dominant cytotoxic T lymphocyte epitope in Indian-origin rhesus monkeys expressing the common MHC class I allele mamu-A*02. *Virology* 301, 365-73 (2002).
157. Pantaleo, G. et al. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 254-8 (1997).
158. Kuroda, M. J. et al. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J Exp Med* 187, 1373-81 (1998).
159. Barouch, D. H. et al. Vaccine-elicited immune responses prevent clinical AIDS in SHIV(89.6P)-infected rhesus monkeys. *Immunol Lett* 79, 57-61 (2001).
160. Barouch, D. H. et al. Elicitation of high-frequency cytotoxic T-lymphocyte responses against both dominant and subdominant simian-human immunodeficiency virus epitopes by DNA vaccination of rhesus monkeys. *J Virol* 75, 2462-7 (2001).
161. Sun, Y., Santra, S., Schmitz, J. E., Roederer, M. & Letvin, N. L. Magnitude and quality of vaccine-elicited T-cell responses in the control of immunodeficiency virus replication in rhesus monkeys. *J Virol* 82, 8812-9 (2008).
162. Mwau, M., McMichael, A. J. & Hanke, T. Design and validation of an enzyme-linked immunospot assay for use in clinical trials of candidate HIV vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18, 611-8 (2002).
163. De Rosa, S. C. et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 173, 5372-80 (2004).
164. Letvin, N. L. et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 312, 1530-3 (2006).
165. Sun, Y. et al. Recombinant vector-induced HIV/SIV-specific CD4+ T lymphocyte responses in rhesus monkeys. *Virology* 406, 48-55.
166. Sodora, D. L. et al. Toward an AIDS vaccine: lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. *Nat Med* 15, 861-5 (2009).
167. Holzammer, S., Holznagel, E., Kaul, A., Kurth, R. & Norley, S. High virus loads in naturally and experimentally SIVagm-infected African green monkeys. *Virology* 283, 324-31 (2001).
168. Silvestri, G. et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18, 441-52 (2003).

169. Baier, M., Dittmar, M. T., Cichutek, K. & Kurth, R. Development of vivo of genetic variability of simian immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8126-30 (1991).
170. Daniel, M. D. et al. A new type D retrovirus isolated from macaques with an immunodeficiency syndrome. *Science* 223, 602-5 (1984).
171. Letvin, N. L. & King, N. W. Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3, 1023-40 (1990).
172. Keele, B. F. et al. Low-dose rectal inoculation of rhesus macaques by SIVsmE660 or SIVmac251 recapitulates human mucosal infection by HIV-1. *J Exp Med* 206, 1117-34 (2009).
173. Manuel, E. R. et al. Dominant CD8⁺ T-lymphocyte responses suppress expansion of vaccine-elicited subdominant T lymphocytes in rhesus monkeys challenged with pathogenic simian-human immunodeficiency virus. *J Virol* 83, 10028-35 (2009).
174. Reimann, K. A. et al. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J Virol* 70, 6922-8 (1996).
175. Reimann, K. A. et al. Viral burden and disease progression in rhesus monkeys infected with chimeric simian-human immunodeficiency viruses. *Virology* 256, 15-21 (1999).
176. Reimann, K. A. et al. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J Virol* 70, 3198-206 (1996).
177. Desrosiers, R. C. & Ringler, D. J. Use of simian immunodeficiency viruses for AIDS research. *Intervirology* 30, 301-12 (1989).
178. Letvin, N. L. Animal models for AIDS. *Immunol Today* 11, 322-6 (1990).
179. McMichael, A. & Hanke, T. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8⁺ T-cell approach feasible? *Nat Rev Immunol* 2, 283-91 (2002).
180. Hennecke, J. & Wiley, D. C. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 104, 1-4 (2001).
181. Doherty, P. J. et al. Expression of the human T cell receptor V beta repertoire. *Mol Immunol* 28, 607-12 (1991).
182. Turner, S. J., Kedzierska, K., La Gruta, N. L., Webby, R. & Doherty, P. C. Characterization of CD8⁺ T cell repertoire diversity and persistence in the influenza A virus model of localized, transient infection. *Semin Immunol* 16, 179-84 (2004).
183. Manuel, E. R. et al. Contribution of T-cell receptor repertoire breadth to the dominance of epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. *J Virol* 80, 12032-40 (2006).
184. Chen, Z. W. et al. T cell receptor V beta repertoire in an acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency viruses and a chimeric simian-human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 182, 21-31 (1995).
185. Chen, Z. W., Kou, Z. C., Shen, L., Reimann, K. A. & Letvin, N. L. Conserved T-cell receptor repertoire in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 151, 2177-87 (1993).
186. Chen, Z. W., Yamamoto, H., Watkins, D. I., Levinson, G. & Letvin, N. L. Predominant use of a T-cell receptor V beta gene family in simian

- immunodeficiency virus Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in a rhesus monkey. *J Virol* 66, 3913-7 (1992).
187. Currier, J. R., Stevenson, K. S. & Robinson, M. A. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding eight new rhesus macaque TCRBV gene families. *Immunogenetics* 51, 387-91 (2000).
188. Levinson, G., Hughes, A. L. & Letvin, N. L. Sequence and diversity of rhesus monkey T-cell receptor beta chain genes. *Immunogenetics* 35, 75-88 (1992).
189. Sen, P. et al. Clonal focusing of epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes in rhesus monkeys following vaccination and simian-human immunodeficiency virus challenge. *J Virol* 82, 805-16 (2008).
190. Pantaleo, G. et al. Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 370, 463-7 (1994).
191. Meyer-Olson, D. et al. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med* 200, 307-19 (2004).
192. Yang, H. et al. Broad TCR usage in functional HIV-1-specific CD8⁺ T cell expansions driven by vaccination during highly active antiretroviral therapy. *J Immunol* 179, 597-606 (2007).
193. McMichael, A., Mwau, M. & Hanke, T. HIV T cell vaccines, the importance of clades. *Vaccine* 20, 1918-21 (2002).
194. Sacre, K. et al. Repertoire, diversity, and differentiation of specific CD8 T cells are associated with immune protection against human cytomegalovirus disease. *J Exp Med* 201, 1999-2010 (2005).
195. Douek, D. C. et al. A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J Immunol* 168, 3099-104 (2002).
196. Janeway, Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Immunobiologie* (De Boeck, 2009).
197. Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique* (Elsevier Masson, 2009).
198. Messaoudi, I., Guevara Patino, J. A., Dyall, R., LeMaoult, J. & Nikolich-Zugich, J. Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science* 298, 1797-800 (2002).
199. Cao, H. et al. Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implications for vaccine development. *J Virol* 71, 8615-23 (1997).
200. Gotch, F. Cross-clade T cell recognition of HIV.1. *Curr Opin Immunol* 10, 388-92 (1998).
201. Turner, S. J., La Gruta, N. L., Kedzierska, K., Thomas, P. G. & Doherty, P. C. Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr Opin Immunol* 21, 286-90 (2009).
202. Ferrari, G. et al. Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1396-401 (1997).
203. Rowland-Jones, S. L. et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest* 102, 1758-65 (1998).
204. Price, D. A. et al. Public clonotype usage identifies protective Gag-specific CD8⁺ T cell responses in SIV infection. *J Exp Med* 206, 923-36 (2009).

205. Appay, V., Douek, D. C. & Price, D. A. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med* 14, 623-8 (2008).
206. Di Fabio, S. et al. Quantitation of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation of cytotoxicity and increased numbers of IFN-gamma producing CD8+ T cells. *Int Immunol* 6, 11-9 (1994).
207. Lalvani, A. et al. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* 186, 859-65 (1997).
208. Miyahira, Y. et al. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 181, 45-54 (1995).
209. Kumar, A., Weiss, W., Tine, J. A., Hoffman, S. L. & Rogers, W. O. ELISPOT assay for detection of peptide specific interferon-gamma secreting cells in rhesus macaques. *J Immunol Methods* 247, 49-60 (2001).
210. Shepp, D. H., Daguillard, F., Mann, D. & Quinnan, G. V. Human class I MHC-restricted cytotoxic T-lymphocytes specific for human immunodeficiency virus envelope antigens. *Aids* 2, 113-7 (1988).
211. Scheibenbogen, C. et al. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods* 244, 81-9 (2000).
212. Kaul, R. et al. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol* 164, 1602-11 (2000).
213. Maino, V. C. & Picker, L. J. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 34, 207-15 (1998).
214. Ferry, B. et al. Intracellular cytokine expression in whole blood preparations from normals and patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 110, 410-7 (1997).
215. Sun, Y. et al. Systemic and mucosal T-lymphocyte activation induced by recombinant adenovirus vaccines in rhesus monkeys. *J Virol* 83, 10596-604 (2009).
216. Almeida, J. R. et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 204, 2473-85 (2007).
217. Almeida, J. R. et al. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 113, 6351-60 (2009).
218. Precopio, M. L. et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 204, 1405-16 (2007).
219. Betts, M. R. et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107, 4781-9 (2006).
220. Bayne, K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist* 39, 199, 208-11 (1996).
221. Knapp, L. A., Lehmann, E., Piekarczyk, M. S., Urvater, J. A. & Watkins, D. I. A high frequency of Mamu-A*01 in the rhesus macaque detected by polymerase chain reaction with sequence-specific primers and direct sequencing. *Tissue Antigens* 50, 657-61 (1997).
222. Yeh, W. W. et al. Compensatory substitutions restore normal core assembly in simian immunodeficiency virus isolates with Gag epitope cytotoxic T-lymphocyte escape mutations. *J Virol* 80, 8168-77 (2006).

223. Sette, A. et al. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 153, 5586-92 (1994).
224. Peters, B. et al. A computational resource for the prediction of peptide binding to Indian rhesus macaque MHC class I molecules. *Vaccine* 23, 5212-24 (2005).
225. Allen, T. M. et al. CD8(+) lymphocytes from simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques recognize 14 different epitopes bound by the major histocompatibility complex class I molecule mamu-A*01: implications for vaccine design and testing. *J Virol* 75, 738-49 (2001).
226. Prilliman, K. R. et al. HLA-B15 peptide ligands are preferentially anchored at their C termini. *J Immunol* 162, 7277-84 (1999).
227. Urvater, J. A. et al. Mamu-I: a novel primate MHC class I B-related locus with unusually low variability. *J Immunol* 164, 1386-98 (2000).
228. Appay, V. et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192, 63-75 (2000).
229. Allen, T. M. et al. Characterization of the peptide binding motif of a rhesus MHC class I molecule (Mamu-A*01) that binds an immunodominant CTL epitope from simian immunodeficiency virus. *J Immunol* 160, 6062-71 (1998).
230. Gauduin, M. C. Intracellular cytokine staining for the characterization and quantitation of antigen-specific T lymphocyte responses. *Methods* 38, 263-73 (2006).
231. Papagno, L., Almeida, J. R., Nemes, E., Autran, B. & Appay, V. Cell permeabilization for the assessment of T lymphocyte polyfunctional capacity. *J Immunol Methods* 328, 182-8 (2007).
232. Lamoreaux, L., Roederer, M. & Koup, R. Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. *Nat Protoc* 1, 1507-16 (2006).
233. McLaughlin, B. E. et al. Nine-color flow cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part I: Panel design by an empiric approach. *Cytometry A* 73, 400-10 (2008).
234. McLaughlin, B. E. et al. Nine-color flow cytometry for accurate measurement of T cell subsets and cytokine responses. Part II: Panel performance across different instrument platforms. *Cytometry A* 73, 411-20 (2008).
235. Appay, V., van Lier, R. A., Sallusto, F. & Roederer, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 73, 975-83 (2008).
236. Horton, H. et al. Optimization and validation of an 8-color intracellular cytokine staining (ICS) assay to quantify antigen-specific T cells induced by vaccination. *J Immunol Methods* 323, 39-54 (2007).
237. Hulot, S. L. et al. Diverse cross-reactive potential and Vbeta gene usage of an epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte population in monkeys immunized with diverse human immunodeficiency virus type 1 Env immunogens. *J Virol* 83, 9803-12 (2009).
238. Malim, M. H. & Emerman, M. HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* 104, 469-72 (2001).
239. Keele, B. F. et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7552-7 (2008).
240. Keele, B. F. & Derdeyn, C. A. Genetic and antigenic features of the transmitted virus. *Curr Opin HIV AIDS* 4, 352-7 (2009).

241. Kearney, M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 population genetics and adaptation in newly infected individuals. *J Virol* 83, 2715-27 (2009).
242. Goulder, P. et al. Co-evolution of human immunodeficiency virus and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Immunol Rev* 159, 17-29 (1997).
243. McMichael, A. T cell responses and viral escape. *Cell* 93, 673-6 (1998).
244. Fischer, W. et al. Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 5, e12303.
245. Wodarz, D. & Levy, D. N. Multiple HIV-1 infection of cells and the evolutionary dynamics of cytotoxic T lymphocyte escape mutants. *Evolution* 63, 2326-39 (2009).
246. Davenport, M. P., Loh, L., Petravic, J. & Kent, S. J. Rates of HIV immune escape and reversion: implications for vaccination. *Trends Microbiol* 16, 561-6 (2008).
247. Loh, L. & Kent, S. J. Quantification of simian immunodeficiency virus cytotoxic T lymphocyte escape mutant viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24, 1067-72 (2008).
248. Mascola, J. R. & Nabel, G. J. Vaccines for the prevention of HIV-1 disease. *Curr Opin Immunol* 13, 489-95 (2001).
249. Nabel, G. J. Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* 410, 1002-7 (2001).
250. Walker, B. D. & Korber, B. T. Immune control of HIV: the obstacles of HLA and viral diversity. *Nat Immunol* 2, 473-5 (2001).
251. Letvin, N. L., Barouch, D. H. & Montefiori, D. C. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* 20, 73-99 (2002).
252. Barouch, D. H. et al. Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *J Virol* 75, 5151-8 (2001).
253. Egan, M. A. et al. Simian immunodeficiency virus (SIV) gag DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *J Virol* 74, 7485-95 (2000).
254. Santra, S. et al. Mosaic vaccines elicit CD8⁺ T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. *Nat Med* 16, 324-8.
255. Hoof, I. et al. Interdisciplinary analysis of HIV-specific CD8⁺ T cell responses against variant epitopes reveals restricted TCR promiscuity. *J Immunol* 184, 5383-91.
256. Bennett, M. S., Ng, H. L., Ali, A. & Yang, O. O. Cross-clade detection of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes does not reflect cross-clade antiviral activity. *J Infect Dis* 197, 390-7 (2008).
257. Barouch, D. H. et al. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat Med* 16, 319-23.
258. Rowland-Jones, S. L. et al. How important is the 'quality' of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? *Immunol Lett* 79, 15-20 (2001).
259. Simons, B. C. et al. Despite biased TRBV gene usage against a dominant HLA B57-restricted epitope, TCR diversity can provide recognition of circulating epitope variants. *J Immunol* 181, 5137-46 (2008).

260. Greenaway, H. Y. et al. Extraction and characterization of the rhesus macaque T-cell receptor beta-chain genes. *Immunol Cell Biol* 87, 546-53 (2009).
261. Sircar, P., Furr, K. L., Dorosh, L. A. & Letvin, N. L. Clonal repertoires of virus-specific CD8+ T lymphocytes are shared in mucosal and systemic compartments during chronic simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* 185, 2191-9.
262. La Gruta, N. L., Turner, S. J. & Doherty, P. C. Hierarchies in cytokine expression profiles for acute and resolving influenza virus-specific CD8+ T cell responses: correlation of cytokine profile and TCR avidity. *J Immunol* 172, 5553-60 (2004).
263. Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R. & Berzofsky, J. A. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4102-7 (1996).
264. Derby, M., Alexander-Miller, M., Tse, R. & Berzofsky, J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J Immunol* 166, 1690-7 (2001).
265. Steinbrook, R. One step forward, two steps back--will there ever be an AIDS vaccine? *N Engl J Med* 357, 2653-5 (2007).
266. Ledford, H. HIV vaccine developers battle on, despite high-profile failures. *Nat Biotechnol* 26, 591-2 (2008).
267. Robb, M. L. Failure of the Merck HIV vaccine: an uncertain step forward. *Lancet* 372, 1857-8 (2008).
268. Watkins, D. I., Burton, D. R., Kallas, E. G., Moore, J. P. & Koff, W. C. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med* 14, 617-21 (2008).
269. Barouch, D. H. & Korber, B. HIV-1 vaccine development after STEP. *Annu Rev Med* 61, 153-67.
270. Belshe, R. et al. Support for the RV144 HIV vaccine trial. *Science* 305, 177-80; author reply 177-80 (2004).
271. Plotkin, S. A. The RV144 Thai HIV vaccine trial. *Hum Vaccin* 6.
272. Rerks-Ngarm, S. et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361, 2209-20 (2009).
273. Berkhout, B. & Paxton, W. A. HIV vaccine: it may take two to tango, but no party time yet. *Retrovirology* 6, 88 (2009).
274. Graham, B. S. What does the report of the USMHRP Phase III study in Thailand mean for HIV and for vaccine developers? *Clin Exp Immunol* 158, 257-9 (2009).
275. Cohen, J. HIV/AIDS research. Beyond Thailand: making sense of a qualified AIDS vaccine "success". *Science* 326, 652-3 (2009).
276. Bourry, O. et al. Effect of a short-term HAART on SIV load in macaque tissues is dependent on time of initiation and antiviral diffusion. *Retrovirology* 7, 78.
277. Limou, S. et al. Genomewide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genomewide Association Study 02). *J Infect Dis* 199, 419-26 (2009).
278. Limou, S. et al. Multiple-cohort genetic association study reveals CXCR6 as a new chemokine receptor involved in long-term nonprogression to AIDS. *J Infect Dis* 202, 908-15.

ANNEXES

Dominant CD8⁺ T-Lymphocyte Responses Suppress Expansion of Vaccine-Elicited Subdominant T Lymphocytes in Rhesus Monkeys Challenged with Pathogenic Simian-Human Immunodeficiency Virus[∇]

Edwin R. Manuel, Wendy W. Yeh, Michael S. Seaman, Kathryn Furr, Michelle A. Lifton, Sandrine L. Hulot, Patrick Autissier, and Norman L. Letvin*

Division of Viral Pathogenesis, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, 330 Brookline Avenue, E/CLS Room 1043, Boston, Massachusetts 02215

Received 19 May 2009/Accepted 17 July 2009

Emerging data suggest that a cytotoxic T-lymphocyte response against a diversity of epitopes confers greater protection against a human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus infection than does a more focused response. To facilitate the creation of vaccine strategies that will generate cellular immune responses with the greatest breadth, it will be important to understand the mechanisms employed by the immune response to regulate the relative magnitudes of dominant and nondominant epitope-specific cellular immune responses. In this study, we generated dominant Gag p11C- and subdominant Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses in *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys through vaccination with plasmid DNA and recombinant adenovirus encoding simian-human immunodeficiency virus (SHIV) proteins. Infection of vaccinated *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys with a SHIV Gag Δp11C mutant virus generated a significantly increased expansion of the Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte response in the absence of secondary Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. These results indicate that the presence of the Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response following virus challenge may exert suppressive effects on primed Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. These findings suggest that immunodomination exerted by dominant responses during SHIV infection may diminish the breadth of recall responses primed during vaccination.

CD8⁺ T lymphocyte responses play a central role in controlling human immunodeficiency virus (HIV) in humans and simian immunodeficiency virus (SIV) infections in nonhuman primates (18, 20, 29, 41). Naturally occurring virus-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses typically focus on a limited number of dominant epitopes (52). However, accumulating data indicate that a broad cellular immune response, in which multiple viral epitopes are recognized by CD8⁺ T lymphocytes, confers better protection against viral replication than a restricted cellular immune response (26, 33). Therefore, it has been suggested that increasing the magnitude of subdominant epitope-specific responses may increase the breadth of a cellular immune response and provide enhanced protection against HIV/SIV replication.

An understanding of the factors that influence the immunodominance hierarchy of viral epitopes will be needed to develop vaccination strategies that can generate the greatest breadth of virus-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. Differences in antigen processing, competition between epitope peptides for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, T-cell receptor (TCR) repertoire, TCR affinity for peptide class I complexes, and immunodomination have been shown to contribute to the dominance of an epitope-specific response (6, 10, 24, 32, 45, 52). In addition, studies have shown

that immunodominance patterns for T-lymphocyte epitopes may differ following a primary and secondary exposure to the same viral antigen (4, 5, 43).

In the present study, we observed that *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys primed with plasmid DNA and boosted with recombinant adenovirus (rAd) vaccines encoding SIVmac239 Gag-Pol-Nef and HIV-1 Env proteins generated Gag p11C- and Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses of comparable magnitude. However, while there was a significant expansion of Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations following challenge with pathogenic simian-human immunodeficiency virus 89.6P (SHIV-89.6P), there was no significant expansion of the Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations. We hypothesized that factors influencing the relative immunodominance of the primed Gag p11C- and Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses after viral challenge may have contributed to the observed differences in their secondary expansion. In the present study, we sought to identify the potential factors contributing to this immunodominance.

MATERIALS AND METHODS

Animals, vaccination, and viral challenge. Rhesus monkeys used in this study were maintained in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee for Harvard Medical School and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Rhesus monkeys were screened for the presence of the *Mamu-A*01* allele by using a PCR-based technique as previously described (17). DNA sequence analysis was performed on all positive samples to confirm identity with the established *Mamu-A*01* sequence (27). Immunized *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys ($n = 9$) were first vaccinated intramuscularly with

* Corresponding author. Mailing address: Beth Israel Deaconess Medical Center, E/CLS 1043, Boston, MA 02215. Phone: (617) 735-4400. Fax: (617) 735-4527. E-mail: nletvin@bidmc.harvard.edu.

[∇] Published ahead of print on 29 July 2009.

plasmid DNA and then boosted 18 weeks later with 10^{12} viral particles of rAd5 expressing SIV Gag-Pol-Nef and HIV-1 Env proteins. These monkeys were then challenged intravenously 14 weeks following rAd5 boost immunization with 1×10^8 RNA copies of either wild-type (WT) SHIV-89.6P ($n = 5$) or the Gag p11C mutant (Δ p11C) SHIV ($n = 4$), a virus constructed from the SHIV-KB9 clone to contain a Gag p11C epitope mutation and a downstream compensatory substitution in *gag* that allow the generation of replication-competent virus (3, 34, 51).

Virus. The WT SHIV-89.6P virus used to infect immunized rhesus monkeys was derived from in vivo passage of SHIV-89.6, a chimeric virus consisting of the SIVmac239 backbone and a primary patient CCR5/CXCR4 dual-tropic HIV-1 89.6 envelope gene (37–39). To produce mutant Δ p11C SHIV for infection of immunized rhesus monkeys, the proviral plasmids for Δ p11C SHIV were transfected into CEMx174 cells (American Type Culture Collection) by the DEAE-dextran method (13). To monitor for virus production, culture supernatants were assessed for SIV p27 antigen by using an SIV core antigen enzyme-linked immunosorbent assay (Beckman-Coulter). Supernatant was harvested every week for 3 weeks, pooled, and aliquoted into 1-ml quantities for use in subsequent infection studies. Prior to pooling, viruses were sequenced to confirm the presence of the *gag* mutations by using a OneStep reverse transcription-PCR (RT-PCR) kit (Qiagen) and the primers *gag*-forward (5'-AGCACCATCTAGTGGCAGAGGA-3) and *gag*-reverse (5'-GAAATGGCTCTTTGGCCCTT-3'). RT-PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega). Individual transformed colonies were subjected to T7/SP6 dideoxy sequencing.

Antibodies, tetramers, and peptides. The monoclonal antibodies (MAbs) used in this study were directly coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) or allophycocyanin (APC). The following MAbs were used: FITC-conjugated anti-CD8 α (clone 7PT3F9; Beckman Coulter) and APC-conjugated anti-CD3 (clone FN18; BioSource International). Mamu-A*01/p11C/ β 2m (SIV Gag) and Mamu-A*01/p41A/ β 2m (HIV-1 Env) tetramer complexes were prepared as previously described (2, 11, 19, 30). Briefly, phycoerythrin-labeled ExtrAvidin (Sigma-Aldrich) was mixed stepwise with biotinylated Mamu-A*01/peptide complexes at a molar ratio of 1:4 to produce the tetrameric complexes. Gag p11C (CTPYDI NQM) and Env p41A (YAPPITGQI) peptides were obtained from QCB/BioSource (Hopkinton, MA). Lyophilized peptides were dissolved in a minimum volume of dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) and diluted to a stock peptide concentration of 15 mg/ml in water containing 5 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich) and then frozen at -70°C in aliquots. Before use, peptides were diluted to a working concentration in RPMI 1640 medium (Mediatech) supplemented with glutamine, 12% fetal calf serum, penicillin, streptomycin, and gentamicin.

Tetramer staining and flow cytometry. Whole-blood specimens were stained with Mamu-A*01/p11C/ β 2m or Mamu-A*01/p41A/ β 2m tetramer for 30 min at room temperature. Cells were then stained with a mixture of APC-anti-CD3 and FITC-anti-CD8 α MAbs for 30 min. Whole-blood specimens (100 μ l) were lysed using a Q-prep workstation (Beckman-Coulter) before being fixed in 1.5% formaldehyde. A total of 3×10^4 events on CD3 $^+$ /CD8 $^+$ T lymphocytes were acquired using a FACSCalibur flow cytometer, and data were analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

MHC purification and peptide binding assay. Stable transfectants expressing the membrane-bound rhesus monkey MHC class I molecule Mamu-A*01 were created in the HLA class I-deficient human B-cell line 721.221, as described previously (35, 47). Mamu-A*01 molecules were purified from cell lysates by using affinity chromatography with the anti-HLA class I (-A, -B, and -C) antibody W6/32 (2). Protein purity, concentration, and depletion efficiency were monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Quantitative assays for peptide binding to detergent-solubilized Mamu-A*01 molecules were based on the inhibition of binding of a radiolabeled standard probe peptide as detailed elsewhere (23). The radiolabeled indicator peptide used for the Mamu-A*01 binding assays was the clade B HxB2 HIV-1 Env p41A epitope (sequence YAPPISGQI). For each peptide tested, the concentration of unlabeled peptide yielding 50% binding inhibition (IC_{50}) of the radiolabeled probe peptide was calculated from three independent experiments.

env sequencing. Viral RNA was isolated from plasma samples of vaccinated, WT SHIV-infected rhesus monkeys 28 days after challenge by using a QIAamp virus RNA isolation kit (Qiagen). Virus sequence analyses were performed on a 600-bp region of *env* containing the Env p41A epitope by amplification with a OneStep RT-PCR kit (Qiagen) and the primers *env*-forward (5'-CTACTACTA TTCCATCCCAGTCTAGCAGAAGAAGA-3') and *env*-reverse (5'-CATCAT CATCATATGAGGGACAATTCTAGAAGT-3'). RT-PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega). Individual transformed colonies were subjected to T7/SP6 dideoxy sequencing.

V β repertoire analysis. TCR V β repertoire analyses were performed as previously described (24, 44). First, Mamu-A*01/p11C/ β 2m and Mamu-A*01/p41A/ β 2m tetramer-binding CD8 $^+$ T-lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of vaccinated rhesus monkeys ($n = 2$) 62 weeks after WT SHIV challenge were isolated through live cell sorting using a fluorescence-activated-cell-sorting Vantage SE flow cytometer (BD Biosciences). RNA was then extracted from these isolated populations by using an RNeasy Mini extraction kit (Qiagen). The integrity of the RNA was confirmed using an Agilent 2100 bioanalyzer. cDNA was then synthesized from the extracted RNA by using a Super SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech). Briefly, the single-stranded cDNA reaction was catalyzed by using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase with the 3' SMART CDS primer II A and Smart II A oligonucleotide primers provided in the Super SMART cDNA synthesis kit. Preamplified double-stranded cDNA libraries were made by a 10- to 20-cycle PCR, utilizing the 5' PCR primer. The optimal number of cycles of preamplification was found by performing a test run in the presence of SYBR green to determine the maximum number of PCR cycles that could be performed in the log-linear amplification range. cDNA derived from each sample was equally distributed into 46 individual PCR mixtures which contained a sense V β family-specific primer, an antisense C β -specific primer, and the TaqMan C β probe. PCRs were carried out using Sure-Start Taq (Stratagene). The real-time PCR was carried out for 55 cycles on an MX4000 (Stratagene), using the following cycling program: 95°C for 10 min, followed by 55 cycles of 95°C for 10 s and 58°C for 30 s, followed by reading of fluorescence, and then 72°C for 30 s.

gag point mutations. To produce Δ p11C SHIV proviral plasmids, the *gag* position 2 p11C (T47I) and downstream compensatory (I71V) mutations (34, 51) were introduced into the SHIV-KB9 5' plasmid obtained from the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program provided by Joseph Sodroski. Mutations were created by PCR mutagenesis with a QuikChange kit (Stratagene). Oligonucleotide primers T47I-Forward (5'-CAGGCACCTGTCAGAAGGTTGCATCCCCTATGACATTAATCAGATGTTAAATTG) and T47I-Reverse (5'-CAATTTAACATCTGATTAATGT CATAGGGGATGCAACCTTCTGACA GTGCCTG) were used to change Thr (ACC) to Ile (ATC). Primers I71V-Forward (5'-GCGGCTATGCAGATTATCAGAGATGTTATAACGAGGAGGCTGCAGATTG-3') and I71V-Reverse (5'-CAATCTGCAGCCTCCTCGTTTATAACATCTCTGATAATCTGC ATAG CCGC-3') were used to change Ile (ATT) to Val (GTT).

Viral load. Numbers of viral RNA copies per ml virus stock or plasma were quantified using an ultrasensitive branched DNA detection assay with a detection limit of >125 RNA copies per ml (Siemens).

Statistical analysis. All statistical differences between groups were calculated by the Mann-Whitney test, using the program GraphPad Prism (version 4.03). A P value of <0.05 between groups was considered statistically significant.

RESULTS

No significant expansion of vaccine-elicited Env p41A-specific CD8 $^+$ T-lymphocyte tetramer responses following SHIV challenge, despite efficient vaccine priming. Mamu-A*01 $^+$ rhesus monkeys ($n = 5$) were immunized using a heterologous prime/boost strategy with plasmid DNA and rAd encoding SIV Gag-Pol-Nef and HIV-1 Env (42). These monkeys were then challenged intravenously with WT SHIV-89.6P. Both Gag p11C- and Env p41A-specific CD8 $^+$ T-lymphocyte tetramer responses were measured following the DNA prime (week 10), following the rAd boost (week 28), on the day of challenge (week 42), and following SHIV-89.6P challenge (peak responses were detected at 16 to 28 days postchallenge) (Fig. 1). Significant differences in mean tetramer responses were determined using the Mann-Whitney test. Surprisingly, the mean value of the Env p41A-specific CD8 $^+$ T-lymphocyte responses ($8.80\% \pm 2.46\%$ of the total CD8 $^+$ T-lymphocyte population in the peripheral blood) after rAd5 vaccination was not significantly different from that of the Gag p11C-specific CD8 $^+$ T-lymphocyte responses ($6.47\% \pm 1.96\%$; $P = 0.7$; not significant). However, infection of the vaccinated rhesus monkeys with WT SHIV resulted in a significant expansion of Gag p11C-specific CD8 $^+$ T lymphocytes ($P = 0.008$) but not Env

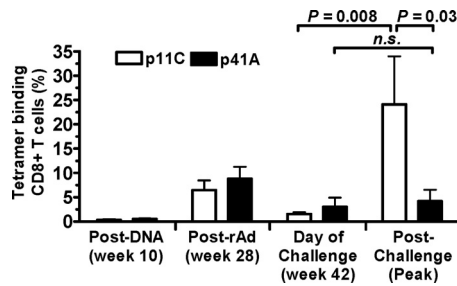


FIG. 1. No significant expansion in the Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte response following SHIV challenge, despite efficient vaccine priming. *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys ($n = 5$) were primed with plasmid DNA, boosted with rAd encoding SIV Gag-Pol-Nef and HIV-1 Env, and then challenged intravenously with SHIV-89.6P. Gag p11C- and Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses were monitored in fresh blood by tetramer staining following the DNA prime (week 10 postimmunization) and the rAd5 boost (week 28 postimmunization), on the day of challenge (week 42 postimmunization), and after challenge. Peak responses after infection were detected at 16 to 28 days postchallenge. Error bars represent the standard errors of the means among the immunized rhesus monkeys. Differences in Gag p11C- and Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses at each time point prior to challenge were not statistically significant (n.s.), as determined by the Mann-Whitney test.

p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes ($P = 0.2$; not significant). Peak Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses after challenge with WT SHIV increased approximately 16-fold in comparison with responses measured on the day of challenge, whereas peak Env p41A responses increased on average less than 2-fold. Therefore, we observed significantly lower percentages of Env p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes compared to those of Gag p11C-specific CD8⁺ T lymphocytes postchallenge ($P = 0.03$). These data suggest that although we were able to induce equivalent epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses by vaccination, these vaccine-induced T lymphocytes do not expand uniformly following virus challenge. Therefore, we initiated a series of studies to determine the mechanism responsible for the deficiency in Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte expansion following WT SHIV challenge.

Env p41A has a greater affinity than Gag p11C for the MHC class I molecule Mamu-A*01. Although the affinity of an epitope peptide for a MHC class I molecule does not always predict the relative dominance of CD8⁺ T-lymphocyte responses following infection, sufficient binding to MHC class I molecules is required for the stability of peptide-MHC class I complexes and proper peptide presentation on the surface of the antigen-presenting cell. To determine if low-affinity binding of the Env p41A peptide might be associated with the relatively poor expansion of Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses to that peptide following SHIV challenge, we assessed the affinity of the Env p41A (YAPPITGQI) and Gag p11C (CTPYDINQM) epitope peptides for Mamu-A*01 by using a cell-free peptide binding assay (22). Mamu-A*01 molecules were incubated with a fixed amount of iodinated indicator peptide and various amounts of the cold competitor peptides Env p41A and Gag p11C or an irrelevant peptide control. These mixtures were assessed for residual I¹²⁵ indicator-MHC class I complexes, and any decreases in counts were expressed as percent inhibition at the tested concentration of

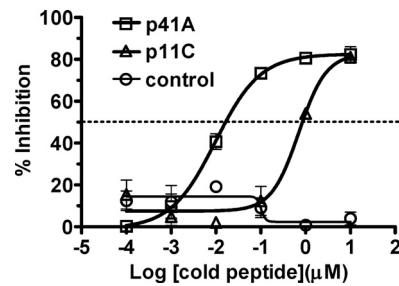


FIG. 2. Env p41A has greater affinity for MHC class I than Gag p11C. A cell-free peptide binding assay was used to determine the inhibition of binding of a radiolabeled indicator peptide to MHC class I by various concentrations of unlabeled Gag p11C (CTPYDINQM), Env p41A (YAPPITGQI), or an irrelevant control peptide. A nonlinear regression (curve fit) line was applied to each data set. The approximate IC₅₀s for Gag p11C and Env p41A are 707 nM and 9.83 nM, respectively. IC₅₀ is the concentration of cold peptide required to inhibit 50% of radiolabeled indicator peptide binding (dashed line).

cold peptide (Fig. 2). Interestingly, nearly 2 logs fewer Env p41A peptides than Gag p11C peptides were required to inhibit 50% of indicator peptide binding, demonstrating that the Env p41A peptide has a higher affinity than the Gag p11C peptide for Mamu-A*01. These data suggest that the absence of Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte expansion following WT SHIV infection of vaccinated rhesus monkeys is not a consequence of insufficient Env p41A binding to MHC class I.

No Env p41A escape mutations in viral clones isolated post-challenge. Numerous studies have documented sudden decreases in epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses during acute HIV/SIV infection due to mutations in epitope sequences that allow virus to escape from immune recognition (1, 31). To determine whether early epitope mutation was responsible for the limited expansion of primed Env p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes following SHIV infection, we sequenced a 600-bp region of *env* containing the p41A epitope from plasma viral RNA 28 days after SHIV-infection in four of five vaccinated rhesus monkeys. We sequenced approximately eight viral clones from each rhesus monkey plasma sample and found no mutations in the Env p41A epitope sequence in comparison with the original WT SHIV that was used to infect the animal (data not shown). Furthermore, in the ~75 amino acids flanking the Env p41A epitope, there was less than one nonsynonymous mutation per clone. The absence of mutations located in and flanking the Env p41A epitope suggests that mutation-related changes in processing or MHC class I binding of the epitope peptide cannot be implicated in the limited expansion of the Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses during acute viremia in these vaccinated rhesus monkeys.

Gag p11C- and Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations have comparably diverse TCR Vβ repertoires. We have previously shown in *Mamu-A*01*⁺ and *Mamu-A*02*⁺ rhesus monkeys that the relative dominance of an epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte response is associated with the clonal diversity of that response (24). Dominant epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations had clonally diverse repertoires, whereas subdominant epitope-specific populations that

consistently generate weak responses had a limited clonal repertoire.

We sought to determine whether the clonal diversity of Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations contributed to the minimal expansion of these cells in vivo following SHIV challenge. To this end, we carried out V β repertoire analyses of Env p41A-specific and Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations in two vaccinated rhesus monkeys 62 weeks after WT SHIV challenge. We used samples from this late time point postchallenge because these were the only samples that were available for these two animals. However, we have previously evaluated the V β repertoire of epitope-specific CD8⁺ T-cell lymphocytes prospectively at multiple time points after infection in vaccinated and infected monkeys and found that the breadths of the repertoire are similar at early and late time points after infection (44).

First, Gag p11C and Env p41A tetramer-binding CD8⁺ T-lymphocyte populations were sorted from PBMCs of vaccinated, SHIV-infected rhesus monkeys. RNA was extracted from each sorted cell population, and cDNA was generated for evaluation in a real-time PCR assay developed to quantify the expression of 25 distinct rhesus V β families and subfamilies (44). As shown in previous studies (24), Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations are relatively polyclonal and employ multiple V β families (Fig. 3A). Interestingly, the Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations (Fig. 3B) are as diverse in the number of TCR V β families they utilize as the Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations. These results suggest that the minimal expansion of primed Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations following WT SHIV infection is not a consequence of a limited clonal repertoire of these cells.

Consequences of abrogated Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses on Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. We then sought to determine whether the primed Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response exerts a suppressive effect on the primed Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte response as these cell populations expand during acute infection (9). To assess this possibility, we constructed a Gag p11C mutant SHIV virus (Δ p11C) by introducing mutations into a pathogenic molecular clone of SHIV-89.6P which have been shown to ablate Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses in vivo (3, 34, 51). Infection of vaccinated *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys with WT SHIV resulted in a significant secondary expansion of the Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response that was maximal at day 21. However, following infection of vaccinated *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys ($n = 4$) with Δ p11C SHIV, an attenuation of the peak secondary Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response was observed on day 14 postchallenge at the time of peak viremia (Fig. 4A) ($P = 0.02$). Although the Gag p11C-specific responses were maximal on day 28 in the vaccinated animals infected with Δ p11C SHIV (Fig. 5A), the magnitude of these responses was negligible, constituting less than 0.5% of the total CD8⁺ T-cell population in PBMCs. This was expected since the Δ p11C SHIV should not have elicited Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. Importantly, the incorporated mutations did not significantly change the kinetics (Fig. 4B) or magnitude (Fig. 4C) of peak viremia from that seen following infection with WT SHIV.

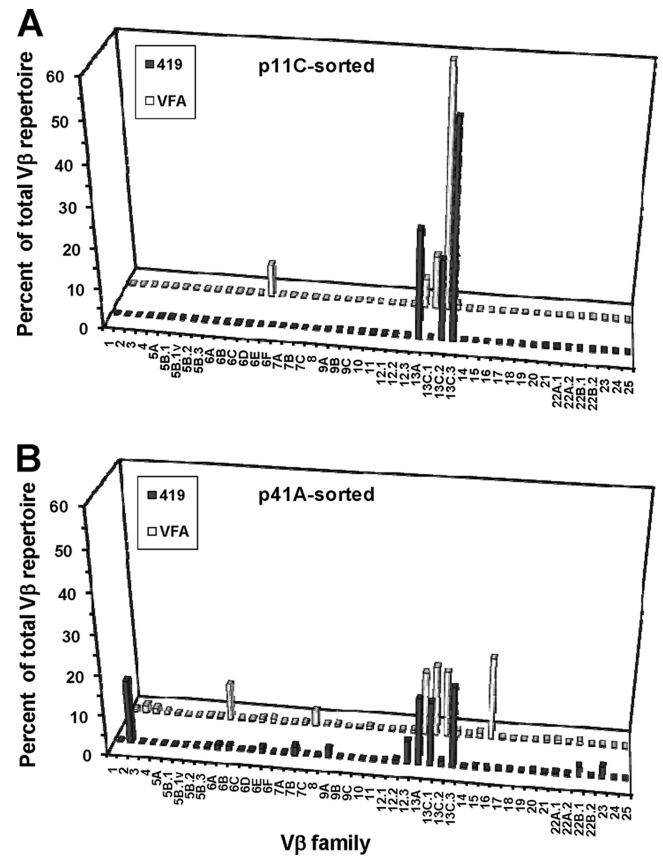


FIG. 3. Gag p11C- and Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations have diverse TCR V β repertoires. PBMCs isolated from two vaccinated rhesus monkeys at week 62 after challenge with WT SHIV were stimulated in vitro with Gag p11C or Env p41A peptide, stained, and sorted using the Gag p11C- or Env p41A-specific tetramer, respectively. cDNAs generated from mRNAs extracted from sorted lymphocytes were used to determine V β repertoires. Repertoire analyses for Gag p11C-sorted (A) and Env p41A-sorted (B) populations are shown.

We then evaluated the kinetics of the peak Env p41A and Gag p11C tetramer responses in the WT and Δ p11C SHIV-infected rhesus monkeys. Both Gag p11C- and Env p41A-specific responses emerged on day 10 in all animals (data not shown). In vaccinated animals that were infected with WT SHIV, the highest Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses were observed on day 10, while Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses continued to expand and were maximal on approximately day 21 ($P = 0.008$) (Fig. 5A). In contrast, in vaccinated rhesus monkeys challenged with Δ p11C SHIV, the peak Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses were observed on average on day 19, soon after peak viremia. The difference in the day of peak Env p41A-specific responses between vaccinated animals that were infected with WT and Δ p11C SHIV was significant ($P = 0.02$). These data suggest that during acute WT SHIV infection, Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses may have exerted early suppressive effects on Env p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes to prevent further expansion beyond day 10. The removal of the dominant T-cell response may have abrogated this suppressive effect, allowing Env p41A-specific CD8⁺ T lympho-

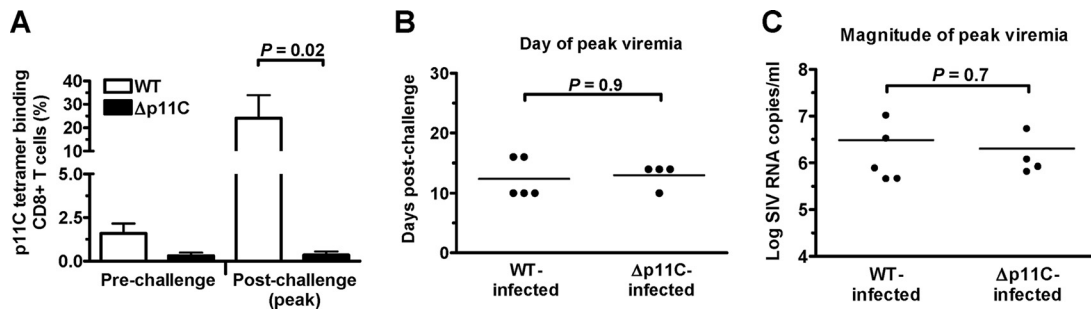


FIG. 4. Mutations in $\Delta p11C$ SHIV abrogate Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses but do not affect the kinetics or magnitude of peak viremia. *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys were DNA primed and rAd boosted with the SHIV immunogens SIV Gag-Pol-Nef and HIV-1 Env and then challenged with either WT SHIV ($n = 5$) or $\Delta p11C$ SHIV ($n = 4$). (A) Gag p11C-specific CD8⁺ tetramer responses pre- and postchallenge in vaccinated *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys were measured. Postchallenge tetramer-binding percentages represent peak responses. Peak Gag p11C epitope-specific responses in $\Delta p11C$ SHIV-challenged rhesus monkeys were compared to peak Gag p11C-specific responses in WT SHIV-89.6P-challenged rhesus monkeys by using the Mann-Whitney test. Time of peak (B) and magnitude of peak (C) viremia in $\Delta p11C$ SHIV-challenged rhesus monkeys were compared to those in WT SHIV-challenged rhesus monkeys. Values are shown for individual rhesus monkeys (●) and the mean of each group (—). Differences in means of peak day and magnitude were not statistically significant, as determined by the Mann-Whitney test.

cytes to continue their expansion and eventually reach a maximal peak at a later time point.

To determine whether the elimination of the Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response facilitated any changes in the expansion of Env p41A-specific recall responses, we assessed the increase in Env p41A tetramer responses following $\Delta p11C$ SHIV infection in vaccinated *Mamu-A*01*⁺ rhesus monkeys (Fig. 5B). WT SHIV infection of vaccinated rhesus monkeys resulted in 3- to 46-fold increases (mean increase, 16.3-fold) in Gag p11C-specific responses in comparison with responses measured on the day of challenge, while the majority of Env p41A-specific responses increased less than 2-fold in the same monkeys (mean increase, 1.86-fold). The difference between the expansions of Gag p11C-specific responses and Env p41A-specific responses after infection with WT SHIV was significant ($P = 0.02$). However, in vaccinated rhesus monkeys infected with $\Delta p11C$ SHIV, we observed 3- to 10-fold increases in the Env p41A-specific responses (mean increase, 7.23-fold). The difference in Env p41A-specific responses between animals infected with $\Delta p11C$ SHIV and WT SHIV-infected animals was significant ($P = 0.04$). These data dem-

onstrate that Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses can significantly suppress the normal kinetics of primed Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses following SHIV infection.

DISCUSSION

The mechanisms by which immunodomination suppresses immune responses to subdominant epitopes are still poorly understood. In murine models, the abrogation of immunodominant epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses has led to the enhancement of subdominant epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses. Such enhanced responses have been shown by infection of knockout mice lacking the restricting MHC class I allele that presents the immunodominant epitope, deletion of immunodominant epitope-specific CD8⁺ T lymphocytes in the thymus, and infection of mice with a viral variant that cannot elicit the immunodominant CD8⁺ T-lymphocyte response (48–50). In the present study, we show an enhanced CD8⁺ T-lymphocyte response to a subdominant SHIV epitope following challenge of vaccinated rhesus mon-

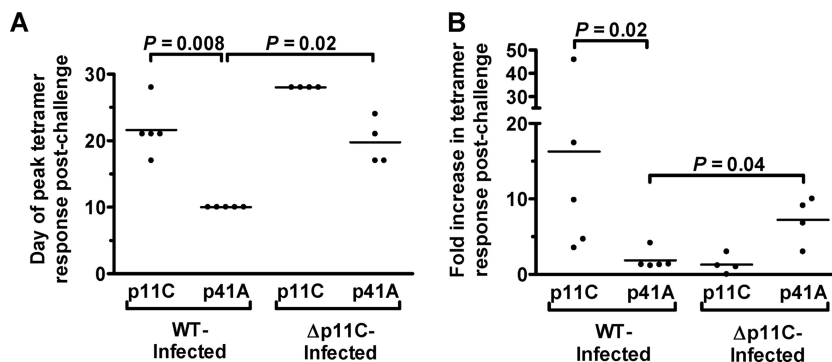


FIG. 5. Significant increases in Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses in the absence of Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses following infection by $\Delta p11C$ SHIV. Time of peak (A) and increase (B) in epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses are shown for Gag p11C and Env p41A in vaccinated rhesus monkeys challenged with WT or $\Delta p11C$ SHIV. Values are shown for individual rhesus monkeys (●) and the mean of each group (—). Times of peak and increases in Env p41A- and Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses in WT and $\Delta p11C$ SHIV-infected rhesus monkeys were compared using the Mann-Whitney test.

keys with an SHIV variant harboring mutations which abrogate the dominant Gag p11C response.

Previous studies from our laboratory have demonstrated altered kinetics of Mamu-A*02-restricted epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses in the presence of the dominant Mamu-A*01-restricted Gag p11C epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte response in *Mamu-A*01*⁺ and *A*02*⁺ rhesus monkeys after SIV infection (31). In the present study, we observed an early suppression of the Mamu-A*01-restricted Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte response in the presence of the dominant Mamu-A*01-restricted Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response following WT SHIV infection of vaccinated rhesus monkeys. This suppression was abrogated when the dominant CD8⁺ T-lymphocyte response was eliminated following infection of vaccinated rhesus monkeys with Δ p11C SHIV. These findings suggest that the dominant Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response has the ability to suppress epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte responses that are restricted by the same or different MHC class I molecules (7, 14, 40). Moreover, despite efficient priming of this lymphocyte population, early suppression of Env p41A-epitope specific CD8⁺ T-lymphocyte responses following SHIV challenge suggests that boosting precursor frequencies of subdominant epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations through vaccination is not sufficient to overcome the immunodomination that arises after SHIV infection.

We were not able to assess the effects of immunodomination on viral replication or disease progression in the present study. The Δ p11C SHIV used to infect animals in the present study exhibited a half-log lower set point plasma RNA level than the WT SHIV in unvaccinated animals (data not shown). These data suggest that Δ p11C SHIV was less fit as a virus and likely intrinsically less pathogenic than the WT SHIV. Therefore, we could not attribute changes in viral load or CD4⁺ T-cell counts after peak viremia to the presence or absence of immunodominant T-cell responses.

It is interesting that the ability of the Gag p11C-specific CD8⁺ T-lymphocyte response to suppress the Env p41A-specific CD8⁺ T-lymphocyte response was observed following infection with WT SHIV but not following vaccination. A similar phenomenon has been observed in murine studies and was attributed to competition among responding CD8⁺ T lymphocytes for epitopes presented on the same antigen-presenting cell. This competition would presumably not occur when competing epitopes are presented at lower frequencies on different antigen-presenting cells or when antigen-presenting cells are present in large excess (12, 14, 15). Therefore, the comparable expansion of epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations following vaccination may be a consequence of low-level transient expression of SHIV gene products, an even distribution of antigen, and/or a slow turnover of antigen-presenting cells. This would result in limited competition among epitope-specific CD8⁺ T-lymphocyte populations. Increased levels of viral antigen during acute SHIV infection may increase competition between CD8⁺ T-lymphocyte populations for antigen-presenting cells, resulting in a dramatic suppression of subdominant CD8⁺ T-lymphocyte populations (50). It is unlikely that the limited secondary expansion of Env p41A-specific CD8⁺ lymphocyte populations following infection with WT SHIV is due to clonal exhaustion, since rhesus monkeys infected with the

Δ p11C SHIV developed a greater expansion of Env p41A-specific CD8⁺ T lymphocytes than was seen following infections with WT SHIV.

The studies in which the MHC class I-peptide binding affinities were characterized yielded unexpected results. While immunodominant epitope peptides usually bind MHC molecules with higher affinity than nondominant epitope peptides (8, 21, 45), the nonimmunodominant Env p41A epitope peptide had a higher binding affinity for Mamu-A*01 molecules than the immunodominant Gag p11C epitope peptide in our assay. Studies have shown that occasional nondominant epitope peptides can have a higher affinity for MHC class I molecules than dominant epitope peptides (28, 36). It is possible that the affinity of a TCR-peptide-MHC interaction (46) or the dissociation rate of the TCR from the peptide-MHC (16, 25) may contribute to the dominance of an epitope in cases where epitope affinity does not correlate with immunodominance. It is also important to note that the in vitro conditions employed in these peptide-MHC class I molecule binding assays may not reflect the in vivo biological conditions of the cellular compartments in which peptide loading occurs.

The major factors contributing to immunodomination are still largely unknown. In the present study, epitope peptide affinity for MHC class I and CD8⁺ T-lymphocyte clonality did not seem to contribute to immunodomination in the rhesus monkey model system. Elucidation of the mechanisms that determine the ability of dominant CD8⁺ T-lymphocyte populations to suppress other epitope-specific responses will advance our understanding of epitope dominance hierarchies and will provide avenues to explore for the development of effective HIV vaccine strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Angela Carville for technical assistance.

This work was supported by National Institutes of Health grant AI20729.

REFERENCES

- Allen, T. M., D. H. O'Connor, P. Jing, J. L. Dzuris, B. R. Mothe, T. U. Vogel, E. Dunphy, M. E. Liebl, C. Emerson, N. Wilson, K. J. Kunstman, X. Wang, D. B. Allison, A. L. Hughes, R. C. Desrosiers, J. D. Altman, S. M. Wolinsky, A. Sette, and D. I. Watkins. 2000. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* **407**: 386-390.
- Allen, T. M., J. Sidney, M. F. del Guercio, R. L. Glickman, G. L. Lensmeyer, D. A. Wiebe, R. DeMars, C. D. Pauza, R. P. Johnson, A. Sette, and D. I. Watkins. 1998. Characterization of the peptide binding motif of a rhesus MHC class I molecule (Mamu-A*01) that binds an immunodominant CTL epitope from simian immunodeficiency virus. *J. Immunol.* **160**:6062-6071.
- Barouch, D. H., J. Kunstman, J. Glowczwskie, K. J. Kunstman, M. A. Egan, F. W. Peyerl, S. Santra, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, K. Beaudry, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin. 2003. Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J. Virol.* **77**:7367-7375.
- Belz, G. T., W. Xie, J. D. Altman, and P. C. Doherty. 2000. A previously unrecognized H-2D(b)-restricted peptide prominent in the primary influenza A virus-specific CD8⁺ T-cell response is much less apparent following secondary challenge. *J. Virol.* **74**:3486-3493.
- Belz, G. T., W. Xie, and P. C. Doherty. 2001. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza A virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol.* **166**:4627-4633.
- Busch, D. H., and E. G. Pamer. 1998. MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J. Immunol.* **160**:4441-4448.
- Chen, W., L. C. Anton, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* **12**:83-93.

8. Chen, W., S. Khilko, J. Fecondo, D. H. Margulies, and J. McCluskey. 1994. Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. *J. Exp. Med.* **180**:1471-1483.
9. Chen, W., and J. McCluskey. 2006. Immunodominance and immunodomination: critical factors in developing effective CD8+ T-cell-based cancer vaccines. *Adv. Cancer Res.* **95**:203-247.
10. Daly, K., P. Nguyen, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 1995. Immunodominance of major histocompatibility complex class I-restricted influenza virus epitopes can be influenced by the T-cell receptor repertoire. *J. Virol.* **69**:7416-7422.
11. Egan, M. A., M. J. Kuroda, G. Voss, J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. I. Lord, M. A. Forman, and N. L. Letvin. 1999. Use of major histocompatibility complex class I/peptide/beta2M tetramers to quantitate CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for dominant and nondominant viral epitopes in simian-human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Virol.* **73**:5466-5472.
12. Grufman, P., E. Z. Wolpert, J. K. Sandberg, and K. Karre. 1999. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* **29**:2197-2204.
13. Karlsson, G. B., M. Halloran, J. Li, I. W. Park, R. Gomila, K. A. Reimann, M. K. Axthelm, S. A. Iliff, N. L. Letvin, and J. Sodroski. 1997. Characterization of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4+ lymphocyte depletion in rhesus monkeys. *J. Virol.* **71**:4218-4225.
14. Kedl, R. M., W. A. Rees, D. A. Hildeman, B. Schaefer, T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* **192**:1105-1113.
15. Kedl, R. M., B. C. Schaefer, J. W. Kappler, and P. Marrack. 2002. T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:27-32.
16. Kersh, G. J., E. N. Kersh, D. H. Fremont, and P. M. Allen. 1998. High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity* **9**:817-826.
17. Knapp, L. A., E. Lehmann, M. S. Piekarczyk, J. A. Urvater, and D. I. Watkins. 1997. A high frequency of Mamu-A*01 in the rhesus macaque detected by polymerase chain reaction with sequence-specific primers and direct sequencing. *Tissue Antigens* **50**:657-661.
18. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**:4650-4655.
19. Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, D. H. Barouch, A. Craiu, T. M. Allen, A. Sette, D. I. Watkins, M. A. Forman, and N. L. Letvin. 1998. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J. Exp. Med.* **187**:1373-1381.
20. Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. E. Nickerson, M. A. Lifton, C. I. Lord, M. A. Forman, and N. L. Letvin. 1999. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J. Immunol.* **162**:5127-5133.
21. Lazarski, C. A., F. A. Chaves, S. A. Jenks, S. Wu, K. A. Richards, J. M. Weaver, and A. J. Sant. 2005. The kinetic stability of MHC class II:peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. *Immunity* **23**:29-40.
22. Loffredo, J. T., J. Sidney, S. Piaskowski, A. Szymanski, J. Furlott, R. Rudersdorf, J. Reed, B. Peters, H. D. Hickman-Miller, W. Bardet, W. M. Rehrauer, D. H. O'Connor, N. A. Wilson, W. H. Hildebrand, A. Sette, and D. I. Watkins. 2005. The high frequency Indian rhesus macaque MHC class I molecule, Mamu-B*01, does not appear to be involved in CD8+ T lymphocyte responses to SIVmac239. *J. Immunol.* **175**:5986-5997.
23. Loffredo, J. T., J. Sidney, C. Wojewoda, E. Dodds, M. R. Reynolds, G. Napoe, B. R. Mothe, D. H. O'Connor, N. A. Wilson, D. I. Watkins, and A. Sette. 2004. Identification of seventeen new simian immunodeficiency virus-derived CD8+ T cell epitopes restricted by the high frequency molecule, Mamu-A*02, and potential escape from CTL recognition. *J. Immunol.* **173**:5064-5076.
24. Manuel, E. R., W. A. Charini, P. Sen, F. W. Peyerl, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, P. Autissier, D. A. Sheeter, B. E. Torbett, and N. L. Letvin. 2006. Contribution of T-cell receptor repertoire breadth to the dominance of epitope-specific CD8+ T-lymphocyte responses. *J. Virol.* **80**:12032-12040.
25. Matsui, K., J. J. Boniface, P. Steffner, P. A. Reay, and M. M. Davis. 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12862-12866.
26. Messaoudi, I., J. A. Guevara Patino, R. Dyall, J. LeMaout, and J. Nikolich-Zugich. 2002. Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science* **298**:1797-1800.
27. Miller, M. D., H. Yamamoto, A. L. Hughes, D. I. Watkins, and N. L. Letvin. 1991. Definition of an epitope and MHC class I molecule recognized by gag-specific cytotoxic T lymphocytes in SIVmac-infected rhesus monkeys. *J. Immunol.* **147**:320-329.
28. Mullbacher, A., M. Lobigs, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, R. Tha Hla, and R. V. Blanden. 1999. High peptide affinity for MHC class I does not correlate with immunodominance. *Scand. J. Immunol.* **50**:420-426.
29. Musey, L., J. Hughes, T. Schacker, T. Shea, L. Corey, and M. J. McElrath. 1997. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **337**:1267-1274.
30. Newberg, M. H., M. J. Kuroda, W. A. Charini, A. Miura, C. I. Lord, J. E. Schmitz, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, K. Kuus-Reichel, and N. L. Letvin. 2002. A simian immunodeficiency virus nef peptide is a dominant cytotoxic T lymphocyte epitope in Indian-origin rhesus monkeys expressing the common MHC class I allele mamu-A*02. *Virology* **301**:365-373.
31. Newberg, M. H., K. J. McEvers, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, S. H. Baumeister, R. S. Veazey, J. E. Schmitz, and N. L. Letvin. 2006. Immunodomination in the evolution of dominant epitope-specific CD8+ T lymphocyte responses in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Immunol.* **176**:319-328.
32. Niedermann, G., S. Butz, H. G. Ihlenfeldt, R. Grimm, M. Lucchiari, H. Hoschutsky, G. Jung, B. Maier, and K. Eichmann. 1995. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* **2**:289-299.
33. Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka, and I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:123-132.
34. Peyerl, F. W., D. H. Barouch, W. W. Yeh, H. S. Bazick, J. Kunstman, K. J. Kunstman, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin. 2003. Simian-human immunodeficiency virus escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition at a structurally constrained epitope. *J. Virol.* **77**:12572-12578.
35. Prilliman, K. R., K. W. Jackson, M. Lindsey, J. Wang, D. Crawford, and W. H. Hildebrand. 1999. HLA-B15 peptide ligands are preferentially anchored at their C termini. *J. Immunol.* **162**:7277-7284.
36. Regner, M., A. Mullbacher, R. V. Blanden, and M. Lobigs. 2001. Immunogenicity of two peptide determinants in the cytolytic T-cell response to flavivirus infection: inverse correlation between peptide affinity for MHC class I and T-cell precursor frequency. *Viral Immunol.* **14**:135-149.
37. Reimann, K. A., J. T. Li, R. Veazey, M. Halloran, I. W. Park, G. B. Karlsson, J. Sodroski, and N. L. Letvin. 1996. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate *env* causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**:6922-6928.
38. Reimann, K. A., J. T. Li, G. Voss, C. Lekutis, K. Tenner-Racz, P. Racz, W. Lin, D. C. Montefiori, D. E. Lee-Parritz, Y. Lu, R. G. Collman, J. Sodroski, and N. L. Letvin. 1996. An *env* gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**:3198-3206.
39. Reimann, K. A., A. Watson, P. J. Dailey, W. Lin, C. I. Lord, T. D. Steenbeke, R. A. Parker, M. K. Axthelm, and G. B. Karlsson. 1999. Viral burden and disease progression in rhesus monkeys infected with chimeric simian-human immunodeficiency viruses. *Virology* **256**:15-21.
40. Roy-Proulx, G., M. C. Meunier, A. M. Lanteigne, S. Brochu, and C. Perreault. 2001. Immunodomination results from functional differences between competing CTL. *Eur. J. Immunol.* **31**:2284-2292.
41. Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sashevile, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Gharyeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**:857-860.
42. Seaman, M. S., L. Xu, K. Beaudry, K. L. Martin, M. H. Beddall, A. Miura, P. A. Sambor, B. K. Chakrabarti, Y. Huang, R. Bailer, R. A. Koup, J. R. Mascola, G. J. Nabel, and N. L. Letvin. 2005. Multicladic human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *J. Virol.* **79**:2956-2963.
43. Selin, L. K., M. Y. Lin, K. A. Kraemer, D. M. Pardoll, J. P. Schneck, S. M. Varga, P. A. Santolucito, A. K. Pinto, and R. M. Welsh. 1999. Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* **11**:733-742.
44. Sen, P., W. A. Charini, R. A. Subbramanian, E. R. Manuel, M. J. Kuroda, P. A. Autissier, and N. L. Letvin. 2008. Clonal focusing of epitope-specific CD8+ T lymphocytes in rhesus monkeys following vaccination and simian-human immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* **82**:805-816.
45. Sette, A., A. Vitiello, B. Reheman, P. Fowler, R. Nayersina, W. M. Kast, C. J. Melief, C. Oseroff, L. Yuan, J. Ruppert, J. Sidney, M. F. del Guercio, S. Southwood, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, H. M. Grey, and F. V. Chisari. 1994. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* **153**:5586-5592.
46. Sykulev, Y., A. Brunmark, M. Jackson, R. J. Cohen, P. A. Peterson, and H. N. Eisen. 1994. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity* **1**:15-22.
47. Urvater, J. A., N. Otting, J. H. Loehrke, R. Rudersdorf, I. I. Slukvin, M. S. Piekarczyk, T. G. Golos, A. L. Hughes, R. E. Bontrop, and D. I. Watkins.

2000. Mamu-I: a novel primate MHC class I B-related locus with unusually low variability. *J. Immunol.* **164**:1386–1398.
48. **van der Most, R. G., L. E. Harrington, V. Giuggio, P. L. Mahar, and R. Ahmed.** 2002. Yellow fever virus 17D envelope and NS3 proteins are major targets of the antiviral T cell response in mice. *Virology* **296**:117–124.
49. **von Herrath, M. G., J. Dockter, M. Nerenberg, J. E. Gairin, and M. B. Oldstone.** 1994. Thymic selection and adaptability of cytotoxic T lymphocyte responses in transgenic mice expressing a viral protein in the thymus. *J. Exp. Med.* **180**:1901–1910.
50. **Weidt, G., O. Utermohlen, J. Heukeshoven, F. Lehmann-Grube, and W. Deppert.** 1998. Relationship among immunodominance of single CD8+ T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response. *J. Immunol.* **160**:2923–2931.
51. **Yeh, W. W., E. M. Cale, P. Jaru-Ampornpan, C. I. Lord, F. W. Peyerl, and N. L. Letvin.** 2006. Compensatory substitutions restore normal core assembly in simian immunodeficiency virus isolates with Gag epitope cytotoxic T-lymphocyte escape mutations. *J. Virol.* **80**:8168–8177.
52. **Yewdell, J. W., and J. R. Bennink.** 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:51–88.

LISTES DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

March 21-March 26, 2010

Keystone Symposium “HIV vaccines”, Banff, Canada.

Poster presentation :

Sandrine L. Hulot, Michael S. Seaman, Lauren A. Dorosh, Bette T. Korber, Norman L. Letvin. **Immunization with a single HIV-1 envelope sequence can generate CD8⁺ T lymphocytes capable of recognizing multiple variant forms of envelope.**

October 19-October 22, 2009

“AIDS Vaccine”, Paris, France.

Poster presentation :

Sandrine L. Hulot, Michael S. Seaman, Lauren A. Dorosh, Bette T. Korber, Norman L. Letvin. **Immunization with a single HIV-1 envelope sequence can generate CD8⁺ T lymphocytes capable of recognizing multiple variant forms of envelope.**

March 22-March 27, 2009

Keystone Symposium “Prevention of HIV/AIDS”, Keystone, CO, USA.

Poster presentation :

Sandrine L. Hulot, Michael S. Seaman, Pritha Sen, Patrick A. Autissier, Edwin R. Manuel, Norman L. Letvin. **The V β families employed by CTL population generated by Env Immunizations cannot predict the capacity of these CTL to recognize epitopes from diverse HIV-1 isolates.**

March 27-April 1, 2008

Keystone Symposium “HIV vaccines”, Banff, Canada.

Poster presentation :

Sandrine L. Hulot, Michael S. Seaman, Pritha Sen, Patrick A. Autissier, Edwin R. Manuel, Norman L. Letvin. **Analysis of V β gene diversity and cross-reactive potential of an epitope-specific CTL population in monkeys immunized with diverse HIV-1 Env Immunogens.**