



HAL
open science

Etude du transfert du VIH-1 des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4 primaires et inhibition par les anticorps neutralisants

Alizé Proust

► **To cite this version:**

Alizé Proust. Etude du transfert du VIH-1 des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4 primaires et inhibition par les anticorps neutralisants. Virologie. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ107 . tel-01149678

HAL Id: tel-01149678

<https://theses.hal.science/tel-01149678>

Submitted on 7 May 2015

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR_S1110 Interactions virus-hôte et maladies hépatiques

THÈSE présentée par :

Alizé PROUST

soutenue le : **20 septembre 2013**

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

Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

**Étude du transfert du VIH-1 des cellules
présentatrices d'antigènes aux
lymphocytes T CD4 primaires et
inhibition par les anticorps
neutralisants**

THÈSE dirigée par :

Mme MOOG Christiane

Directeur de Recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. BRAND Denys

PR-PU, université de Tours

Mme CHAKRABARTI Lisa

Chef de laboratoire, Institut Pasteur de Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. NEGRONI Matteo

Directeur de recherche, université de Strasbourg

*A mes Parents et
Aux trois autres Fantastiques*

*"To see a world in a grain of sand
And a heaven in a wild flower,
Hold infinity in the palm of your hand,
And eternity in an hour"*

Auguries of Innocence, William Blake

REMERCIEMENTS

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements. La difficulté tient dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas ici et qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury, Lisa Chakrabarti, Denys Brand et Matteo Negroni pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce manuscrit et ainsi d'évaluer mon travail de thèse malgré leurs emplois du temps chargés.

Un grand merci à Sidaction pour m'avoir financée durant ces trois ans. Sans votre association je n'aurais pas pu réaliser ce projet.

Je remercie Catherine Florentz et Serge Potier qui ont répondu présents dans les moments les moins faciles de cette thèse. Merci pour votre écoute et votre soutien. Les doctorants ont énormément de chance de vous avoir.

Je remercie le Professeur Thomas Baumert de m'avoir accueillie dans un laboratoire d'excellence comme il en n'existe peu en France.

Je remercie Christiane Moog pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi intéressant, important et actuel.

Je remercie également Vincent Holl sans qui j'aurais été perdue au début. Merci Vincent d'avoir encadré mon travail durant mon stage de Master. Merci de ta confiance et de ton soutien durant ces six premiers mois au laboratoire. Apprendre à travailler à tes côtés a été un réel plaisir. Merci pour ton enthousiasme et ton dynamisme et pour toutes ces soirées où je t'ai fait partir à pas d'heure car je ne comprenais rien à mes résultats de cytométrie.

Merci à Sylvie pour m'avoir tout appris sur les macrophages. Je suis bien loin de les connaître aussi bien que toi mais je tiens à te remercier pour ta patience et ta confiance durant cette thèse. Merci également pour m'avoir appris à "manipuler" correctement.

Un remerciement spécial à Julien et Alex pour m'avoir appris (en plus d'autres choses bien plus scientifiques) que j'étais un kinder: brune à l'extérieur, blonde à l'intérieur (comment aurais-je pu savoir à l'époque que Milteniy était une marque et non un nom de famille !?!).

Merci à Thomas pour ta bonne humeur constante, tes emails/sms alors qu'on est à 3 mètres l'un de l'autre qui n'ont jamais cessé de me faire rire (ou au moins sourire) et ton écoute sans faille.

Je remercie Mélanie pour les lectures, relectures... re-re-lectures de ce manuscrit ou de toute autre chose en rapport avec le laboratoire. Merci pour les déchiffrages des hiéroglyphes de la chef, pour les excellents gâteaux (au moins tu sais que le salon de thé est envisageable pour la reconversion), pour les ELISA et pour avoir été une voisine parfaite (bien que ma règle se soit souvent mystérieusement translaturée sur ton bureau !).

Remerciements

Merci à Bin et Marina pour les échanges de points de vue plus ou moins scientifiques. Pour leurs accents (respectivement chinois et argentin) qui m'ont fait voyager sans bouger du labo. Marina, je compte bien visiter un jour l'Argentine et t'y faire un coucou !

Merci à Gégé pour les fous rires. Je pense ne pas connaître d'autres personnes capables d'autant parler de ses week-end que toi. Tu es la fraîcheur incarnée.

Merci à Maryse qui elle aussi à subi les lectures et relectures de la thèse et de l'article.

Merci aux salles E309 et E308 (pièces "HCV") pour m'avoir accueillie lorsque l'évasion du bureau se faisait nécessaire.

Je remercie les "jeunes" pour les bons moments de discussion à la cafet'. Mat, Catherine F, Lamine, je vous souhaite bon courage. La fin est proche et je suis de tout cœur avec vous. Le bout du tunnel sera plus long à atteindre pour Émilie et Sophie mais vous allez gérer ça comme des chefs. Les beer times de fin de semaine se sont faits de moins en moins nombreux au fil des départs, à vous de les relancer. Merci à Sarah, Laura et Charlotte pour leur bonne humeur de tous les jours. Sarah, ton calme et ta patience m'ont souvent fait me demander pourquoi je m'énervais pour des choses insignifiantes. Tu seras une maman merveilleuse pour "Isabello". Laura et Charlotte, votre caractère "emporté" m'aura souvent fait rire. Vous vous complétez à merveille toutes les trois. Après les "4 Fantastiques" avons nous trouvé les "3 Mousquetaires"?!?

Merci aux soutiens logistiques sans qui le labo ne pourrait pas tourner correctement. On vient généralement peu vous voir mais vous faites énormément. Un grand merci à Sigis, Anne, Catherine C, Jeremy, Patricia, Richard, Dominique et Halima.

En vrac mais loin d'être moins important: Merci au Roi des Sudoku Rajeev pour sa compréhension et son inquiétude dès que j'avais un coup de mou. Merci au seul homme parmi toutes les femmes du déjeuner : Éloi. Tu n'es pas là depuis bien longtemps mais ton intégration si rapide montre bien à quel point tu es adorable et sympathique. Merci à Catherine S pour ses conseils avisés.

Un grand merci à mes amis hors labo (oui oui, il y a une vie en dehors du labo). Ceux qui ne savent pas ce qu'est un P3 ou ce que signifie le terme "maniper". Greg, Mat, Karine, Vincent, Seb et autres joueurs d'OdL, c'est une vraie bouffée d'air frais que de discuter avec vous. Évasion garantie vers un "quelque part" bien loin de la thèse. Merci à Lionel pour les dépannages word/pdf, tu es un chef !

Un immense merci aux trois autres fantastiques: Laetitia, Isabel et Marine. Merci les filles pour votre soutien inconditionnel dans les bons comme dans les moins bons (voir très mauvais) moments. Merci pour votre bonne humeur sans laquelle ces trois ans auraient été plus que difficiles. Marine, je ne pensais pas qu'un estomac pouvait supporter autant de chose. J'en reste encore hallucinée.

Isa, tu as été la première de nous quatre à partir et je n'imaginai pas que tu me manquerais tant (comment peut-on aller à Totoro sans toi?!?!). Merci pour ta chaleur et ton écoute sans faille.

Choupie... Il est difficile de résumer en quelques lignes les remerciements que je dois à la personne qui a été la plus proche de moi au labo durant ces 3 ans. Merci pour ces heures passées au téléphone alors qu'au début de la conversation, on avait "rien à se dire". Merci pour les fous rires, la compréhension mutuelle sans que la moindre parole ne soit prononcée, les restos les trucs louches de chez Paris Store, le tea time de 16h00 (un incontournable bien souvent accompagné de Christine !) et, accessoirement, merci pour la correction de ce manuscrit. Un jour on fera Rock'N'Roller Coaster je te le promets ! En attendant, nous nous contenterons de Londres (ce qui est plus qu'un bon compromis).

Merci à Oasis, Saez, Noel Gallagher's High Flying Birds, Coldplay, Aerosmith, Beady Eye, Stereophonics, Muse, U2, The Verve et bien d'autres encore de m'avoir accompagnée pendant l'écriture de ce manuscrit. Vous ne vous doutez sûrement pas que vos musiques m'ont évité de "péter un câble" et m'ont permis de m'évader et de rester (plus ou moins) saine d'esprit.

Merci à ma sœur et mon frère (et leur valeur ajoutée respective) et à Leïa. Bien que vous soyez loin, vous m'avez tous les cinq soutenus durant cette thèse. Vous avez écouté mes coups de gueules et les explications de mon travail sans broncher alors que vous n'y compreniez rien. Vous êtes au top ! Émilie & David, vous m'avez fait le plus beau cadeau de thèse il y a environ trois mois. Merci à vous et bienvenue à Maëliiss.

Pour finir, un merci, même immense, ne serait pas suffisant pour mes parents. Vous méritez une ovation pour m'avoir permis de poursuivre mes études et pour votre soutien à toute épreuve. J'ai compris grâce à vous ce que signifiait l'expression "tout donner" car oui, vous m'avez littéralement tout donné. Vous êtes depuis bientôt 27 ans là à chaque fois que j'en ai besoin, présents sur tous les fronts sans faillir. Je vous aime.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS - Contexte général	1
INTRODUCTION	5
Chapitre 1 : Généralités sur le VIH	
<hr/>	
1. Découverte du VIH et Histoire du SIDA	6
2. Structure du VIH-1, organisation génomique et cycle de réplication	7
2.1. <i>Structure virale</i>	7
2.2. <i>Organisation génomique</i>	8
2.3. <i>Cycle de réplication</i>	9
2.3.1. Entrée du virus : attachement et fusion.....	9
2.3.2. Décapsidation et rétro-transcription.....	9
2.3.3. Intégration et transcription.....	10
2.3.4. Assemblage, bourgeonnement et maturation.....	10
3. Variabilité génétique du VIH	13
3.1. <i>Mécanismes de la variabilité génétique</i>	13
3.2. <i>Classification du VIH</i>	13
3.2.1. Groupes M, N, O et P, et sous-types du VIH-1	13
3.2.2. Formes recombinantes circulantes (CFR).....	15
3.3. <i>Distribution globale des souches virales du VIH-1</i>	15
4. Voies de transmission du VIH	16
4.1. <i>Partage de seringues chez les consommateurs de drogues</i>	16
4.2. <i>Transfusions sanguines et sang contaminé</i>	16
4.4. <i>Transmission de la mère à l'enfant</i>	17
4.5. <i>Transmissions sexuelles</i>	18
5. Chronologie de l'infection à VIH-1	20
6. Prévention et traitements actuels.....	21
6.1. <i>Prévention</i>	21
6.1.1. La circoncision.....	21
6.1.2. Les microbicides	22
6.1.3. La prophylaxie pré-exposition et les traitements en prévention.....	22
6.2. <i>Traitements</i>	23

Chapitre 2 : Physio- et immuno-pathologies de l'infection par le VIH-1

1. VIH et cellules cibles: les cellules de l'immunité en ligne de mire.....	25
1.1. Co-récepteurs du VIH-1 et tropisme	25
1.2. Lymphocytes T CD4 ⁺	27
1.3. Cellules dendritiques	27
1.4. Macrophages	28
1.5. Autres cellules cibles	28
1.5.1. Lymphocytes T CD8 ⁺	28
1.5.2. Lymphocytes B	29
1.5.3. Cellules "Natural Killer" (NK)	29
2. Résistance à l'infection et à la progression.....	29
2.1. Mutation du co-récepteur CCR5	30
2.2. Polymorphisme des gènes HLA	30
2.3. Ligands naturels des corécepteurs: les chimiokines	31
2.4. Facteurs de restrictions cellulaires	31
2.4.1. La téthérine	31
2.4.2. La protéine TRIM5α	32
2.4.3. La famille de protéines APOBEC3	32
2.4.4. La protéine SAMHD1	33
3. VIH-1 et système immunitaire	34
3.1. Réponses immunitaires de l'hôte.....	34
3.1.1. Immunité innée	34
3.1.2. Immunité adaptative.....	35
3.1.2.1. Immunité cellulaire	35
3.1.2.2. Immunité humorale	35
3.2. Anticorps et VIH-1	36
3.2.1. Mécanismes de protection médiés par les anticorps.....	36
3.2.1.1. Neutralisation	36
3.2.1.2. Le système du complément.....	37
3.2.1.3. Récepteurs Fcγ et immunité spécifique du VIH-1	37
3.2.1.3.1. Inhibition du VIH-1 par les RFc	38
3.2.1.3.2. ADCC.....	38

3.2.1.3.3. <i>ADCVI</i>	39
3.2.2. Réponse anticorps contre le VIH-1	39
3.2.3. Anticorps neutralisants monoclonaux spécifiques du VIH-1	39
3.2.3.1. Anticorps neutralisants et élites contrôleurs.....	39
3.2.3.1. Anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1	40
3.2.3.1.1. <i>Glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41</i>	41
3.2.3.1.2. <i>Anticorps dirigés contre le site de fixation au CD4</i>	41
3.2.3.1.3. <i>Anticorps dirigés contre des sucres de la gp120</i>	42
3.2.3.1.4. <i>Anticorps dirigés contre les boucles V1/V2 et V3</i>	42
3.2.3.1.5. <i>Anticorps dirigés contre le site du CD4 induit</i>	43
3.2.3.1.6. <i>Anticorps dirigés contre la région MPER de la gp41</i>	43
3.2.4. Stratégies virales pour contrer les anticorps neutralisants	44
3.2.5. Modèles primates: challenge et immunisation passive.....	44
4. Vaccination.....	45
4.1. Développement d'un vaccin contre le VIH	46
4.2. Les essais vaccinaux: échecs et espoirs	47
4.2.1. Essai AIDSVAX	47
4.2.2. Essai STEP.....	47
4.2.3. Essai HVTN 505	48
4.2.4. Essais PAVE et Phambili.....	48
4.2.5. Essais RV144 - essai "Thai" et RV305	48
 Chapitre 3 : VIH-1 et cellules présentatrices d'antigènes	
<hr/>	
1. Susceptibilité des cellules présentatrices d'antigènes à l'infection par le VIH-1	50
1.1. <i>Cellules dendritiques et infection par le VIH-1</i>	50
1.1.1. Génération de DCs <i>in vitro</i> pour l'étude de l'infection à VIH-1	50
1.1.1.1. Cellules dendritiques dérivées de monocytes.....	50
1.1.1.2. Cellules dendritiques de Langerhans et interstitielles	50
1.1.2. Interactions cellules dendritiques - VIH-1	51
1.2. <i>Infection des macrophages par le VIH-1</i>	51
1.2.1. Génération des macrophages <i>in vitro</i>	51
1.2.2. Susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1	52
2. Cellules présentatrices d'antigènes et VIH-1: de l'infection à la dissémination.....	52

2.1. Mécanismes de transfert du VIH-1 des cellules dendritiques aux cellules T.....	53
2.2.1. La synapse virologique	53
2.1.2. Le transfert en <i>trans</i>	53
2.1.2.1. Transfert direct du virus	53
2.1.2.2. Transfert par la voie de sécrétion des exosomes	54
2.1.3. Le transfert en <i>cis</i>	55
2.1.4. Transfert du virus des cellules de Langerhans aux lymphocytes T CD4 ⁺	56
2.2. Transfert du VIH-1 des macrophages aux lymphocytes T CD4 ⁺	57
2.3. Rôle des récepteurs alternatifs dans l'infection des cellules présentatrices d'antigène et le transfert du virus.....	57
2.3.1. La langerine	57
2.3.2. Le DC-SIGN	58
2.3.3. Les siglecs.....	58
2.3.4. Le DCIR.....	58
2.3.5. Le récepteur au mannose	58
2.3.6. Les syndécanes.....	59
3. Inhibition par les anticorps de l'infection des cellules présentatrices d'antigènes et du transfert du VIH-1 aux cellules T CD4 ⁺	59
3.1 Neutralisation de l'infection des cellules présentatrices d'antigènes	59
3.2. Inhibition du transfert du VIH-1 aux lymphocytes T CD4 ⁺ par les anticorps	60
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	62
RÉSULTATS	64
Manuscrit 1 : Transfert efficace du VIH-1 en trans et en cis des cellules dendritiques de type Langerhans et des macrophages aux lymphocytes T autologues.....	65
Manuscrit 2 : Les anticorps neutralisants anti-gp120 inhibent plus efficacement le transfert du VIH-1 des macrophages aux lymphocytes que l'infection par le virus libre.....	87
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	111
ANNEXES	118
Publication 1 : Les anticorps neutralisants inhibent le transfert du VIH-1 des cellules dendritiques primaires aux lymphocytes T CD4 autologues	119
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	132

ABRÉVIATIONS

AcN :	Anticorps neutralisant
AcNNI :	Anticorps non-neutralisant inhibiteur
Ad5 :	Adénovirus de type 5
ADCC :	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ADCVI :	Antibody dependent cell-mediated virus inhibition
ADN :	Acide désoxyribonucléique
APOBEC :	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ARN :	Acide ribonucléique
CD :	Cluster de différenciation
CDRH3 :	Complementarity determining region H3
CF :	Cytométrie en flux
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRF :	Forme recombinante circulante
CypA :	Cyclophiline A
APC :	Cellule présentatrice d'antigène
CTL :	Cytotoxic T lymphocyte
DC :	Cellule dendritique
DCIR :	Dendritic cell immunoreceptor
DC-SIGN :	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
dNTP :	Désoxynucléotide
Env :	Enveloppe glycoprotéine
Gag :	Group-specific antigen
GM-CSF :	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
gp :	glycoprotéine
HEPS :	Highly exposed, persistently seronegative
HLA :	Human leukocyte antigen
HSH :	Homme ayant des rapports sexuels avec des hommes
HSPG :	Protéoglycane héparane sulfate
HTLV :	Human T-lymphotrophic virus
IF :	Immunofluorescence
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IDC :	Cellule dendritique interstitielle
ITAM :	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM :	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
LC :	Cellules dendritiques de type Langerhans
LNTP :	Non progresseurs à long terme
LPS :	Lipopolysaccharide
LTR :	Séquence terminale répétée
M-CSF :	Macrophage colony-stimulating factor
MoDC :	Cellule dendritique dérivée de monocyte

MDM :	Macrophage dérivé de monocyte
MPER :	Membrane-proximal external region
MVB :	Corps multivésiculaire
Nef :	Negativ factor
NK :	Cellules natural killer
PAMP :	Pathogen associated molecular pattern
PBL :	Lymphocyte du sang périphérique
PBMC :	Cellules monocucléées du sang périphérique
PNGS :	Site potentiel de N-glycosylation
Pol :	Polymerase
PreP :	Prophylaxie pré-exposition
PRR :	Pattern recognition receptor
RANTES :	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
Rev :	Regulator of viral gene expression
RFc :	Récepteur Fc
RRE :	Rev response element
SAMHD1 :	Sterile alpha motif domain and histidin-aspartic domain-containing protein 1
sCD4 :	CD4 soluble
SCF :	Stem cell factor
SDF-1 :	Stromal derived factor 1
SEVI :	Semen-derived enhancer of virus infection
SHIV :	Simian-human immunodeficiency virus
SIDA :	Syndrome de l'immunodéficience acquise
Siglec :	Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin
SIV :	Virus de l'immunodéficience simienne
SLPI :	Secretory leukocyte protease inhibitor
IC :	Concentration inhibitrice
TasP :	Treatment as prevention
TAR :	Trans-activation response element
Tat :	Transcriptional activator
TGF :	Transforming growth factor
TNF :	Tumor necrosis factor
TPO :	Trombopoietine
TRAIL :	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIM :	Tripartite motif protein
Vif :	Viral infectivity factor
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
Vpr :	Viral protein R
Vpu :	Viral protein U
VS :	Synapse virologique

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Estimation du nombre de personne vivant avec le VIH dans le monde	2
Figure 2. Prévalence mondiale estimée du VIH-1 en 2011	3
Figure 3. Particule virale de VIH-1 mature	7
Figure 4. Organisation du génome du VIH-1 et résumé des fonctions de ses gènes	8
Figure 5. Représentation schématique des étapes précoces de la fusion du VIH-1	9
Figure 6. Cycle de réplication du VIH-1	12
Figure 7. Diversité génétique du VIH.	14
Figure 8. Distribution mondiale des sous-types et des recombinants du VIH-1	16
Figure 9. Voies de transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses sexuelles.....	19
Figure 10. Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1.....	21
Figure 11. Action des antirétroviraux pour le traitement de l'infection à VIH	24
Figure 12. Photographie de microscopie électronique de particules de VIH à la surface d'un lymphocyte T CD4 ⁺ infecté.....	25
Figure 13. Modèle d'utilisation des corécepteurs et tropisme du VIH-1.....	26
Figure 14. Mécanismes d'action des anticorps contre le VIH-1	36
Figure 15. Récepteurs pour le segment Fc des IgG identifiés chez l'Homme.....	38
Figure 16. Épitopes reconnus par les anticorps neutralisants à large spectre.....	40
Figure 17. Représentation du trimère de gp120.	41
Figure 18. Modèles de transfert du VIH-1 en <i>trans</i> des DCs aux lymphocytes T CD4.....	55
Figure 19. Mécanismes de transmission du VIH-1 des DCs aux lymphocytes T CD4	56
Tableau 1. Profil anti-VIH des protéines APOBEC3.....	33
Tableau 2. État des connaissances sur l'inhibition du transfert du VIH-1 de cellule à cellule par les anticorps.....	61

AVANT-PROPOS

Contexte général

En 1983, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été associé à l'agent étiologique du Syndrome de l'Immunodéficience Acquis (SIDA) (Barré-Sinoussi et al., 1983). Depuis, l'infection par ce pathogène a causé une pandémie, avec un nombre d'individus infectés par le VIH et de décès dus au SIDA dépassant respectivement les 70 et 35 millions de personnes. Du fait de la diminution du nombre de nouvelles infections à VIH et de la mortalité due au SIDA au cours des dernières années, la prévalence mondiale de l'infection à VIH semble s'être stabilisée depuis la fin du 20^{ème} siècle (Figure 1) (ONUSIDA, 2012). Cela est dû à un accès plus large aux traitements antirétroviraux. Cependant, la thérapie antirétrovirale permet de prolonger la vie des patients mais n'élimine pas le virus de l'organisme et le seul espoir d'endiguer la pandémie reste le développement d'un vaccin.

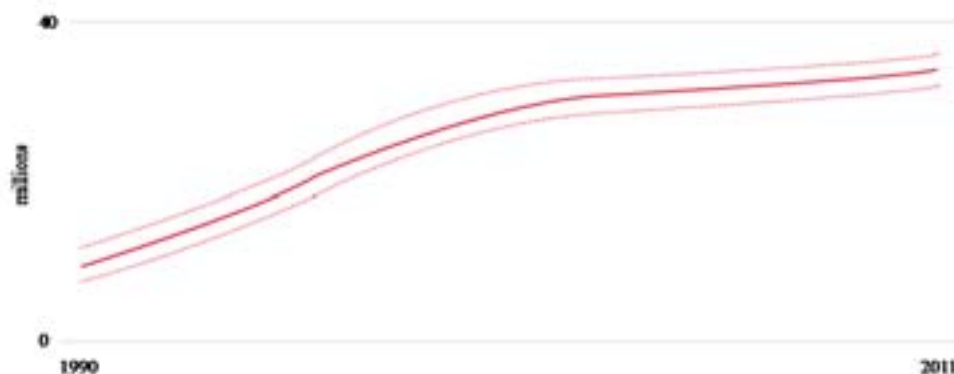


Figure 1. Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde entre 1990 et 2011. Les pointillés indiquent la marge d'erreur autour de l'estimation (ONUSIDA, 2012).

Fin 2011, l'ONUSIDA et l'OMS estimaient à 34 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH, dont 2,5 millions nouvellement infectées et 1,7 millions de décès par an (figure 2) (ONUSIDA 2012). Deux grandes tendances se sont dessinées. Premièrement, une épidémie "durable" dans la population générale de nombreux pays d'Afrique subsaharienne. Deuxièmement, l'épidémie dans le reste du monde est concentrée dans des groupes spécifiques à risque tels que les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH), les consommateurs de drogues injectables, les travailleurs du sexe et leurs partenaires sexuels.

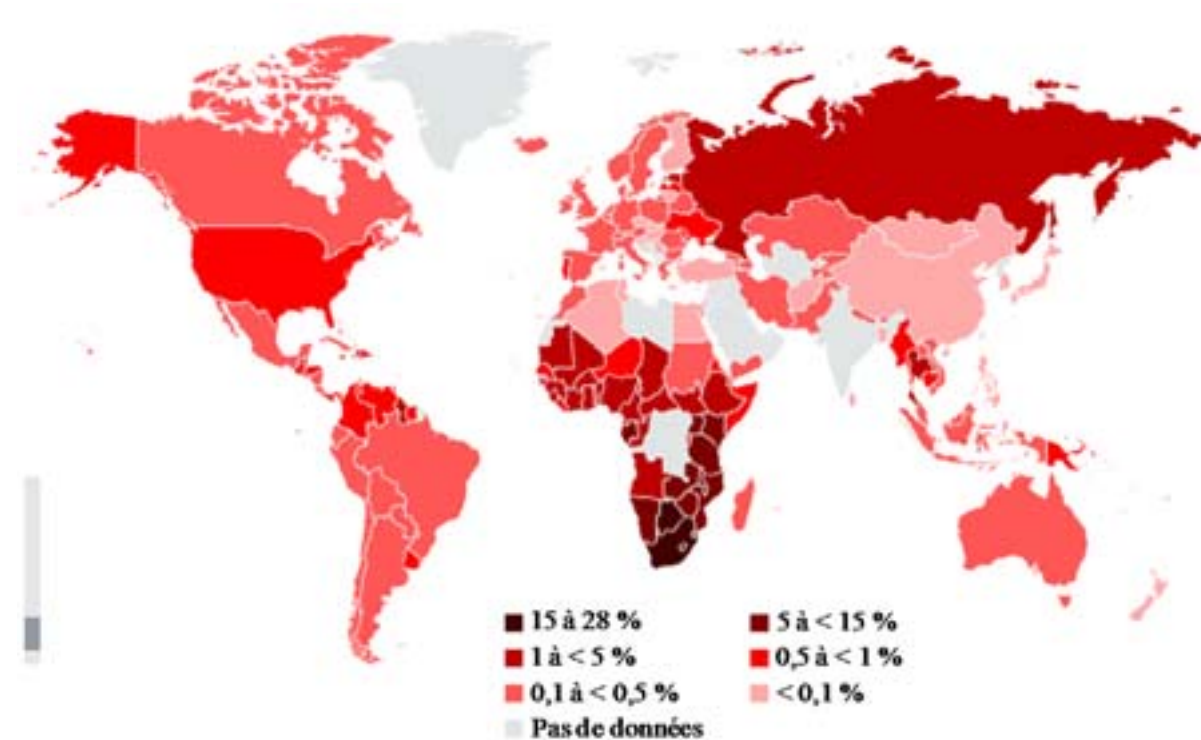


Figure 2. Prévalence mondiale estimée du VIH-1 en 2011 (ONUSIDA, 2012).

Dans les pays à revenus élevés, l'épidémie de VIH n'est toujours pas terminée. En effet, en **Amérique du Nord** et en **Europe Occidentale et Centrale** le nombre total de personnes vivant avec le VIH en 2011 s'est accru par rapport à 2001 passant de 1,1 millions à 1,4 millions pour l'Amérique du Nord et de 640 000 à 900 000 pour l'Europe Occidentale et Centrale. Les décès liés au SIDA sont cependant stables, de même que les taux de nouvelles infections à VIH. Dans ces régions, la prévalence du VIH parmi les HSH joue un rôle considérable dans les épidémies nationales de VIH. En effet, il a été observé en France, aux Pays-Bas et au Canada, par exemple, une prévalence du VIH de plus de 15% parmi les HSH comparé à une prévalence nationale de moins de 0,5% parmi la population générale. En outre, en Europe Occidentale et Centrale, moins d'un HSH sur trois a été testé pour le VIH au cours de l'année 2011 malgré l'importance de la prévalence du VIH parmi les HSH (ONUSIDA, 2012). De plus, et malgré la prévention publicitaire mise en place en France, il a été récemment estimé que sur les 150 000 personnes vivant avec le VIH en France, 30 000 ne savent pas qu'elles sont infectées alors que pour 59% d'entre elles, leur nombre de lymphocytes T CD4⁺ justifierait une mise sous traitement antirétroviral, révélant ainsi l'importance d'un dépistage précoce et de la mise en place d'un vaccin.

En **Europe Orientale** et en **Asie Centrale**, une augmentation de la prévalence du VIH, des nouvelles infections à VIH et des décès liés au sida a été observée. En effet, dans ces régions, l'accès aux traitements contre le VIH reste faible. Il a été estimé que seuls 25% des personnes éligibles pour le traitement contre le VIH en bénéficient. Seuls la Géorgie et la Roumanie ont atteint une couverture du traitement de plus de 60%. Les épidémies de VIH en Europe

orientale et en Asie centrale sont majoritairement dues à l'injection de drogues sans respect de l'hygiène et à la transmission ultérieure du virus à leurs partenaires sexuels (ONUSIDA, 2012).

En **Océanie** et **Asie du Sud et du Sud-est**, la réduction des nouvelles infections à VIH et des décès liés au SIDA entre 2001 et 2011 a progressé contrairement à l'**Asie de l'Est** où ces nouvelles infections et décès liés au SIDA sont en augmentation (passage de 390 000 personnes vivant avec le VIH en 2001 à 830 000 en 2011). Les épidémies de VIH en Asie et dans le Pacifique restent largement concentrées parmi les consommateurs de drogues injectables, les HSH et les professionnel(le)s du sexe (ONUSIDA, 2012).

L'**Afrique subsaharienne** est la région la plus gravement touchée par la pandémie de SIDA représentant 69% des personnes vivant avec le VIH / SIDA dans le monde et 70% de tous les décès dus au SIDA. Le mode de contamination majeur est la transmission hétérosexuelle avec, dans certaines régions, un pourcentage plus élevé de femmes infectées que d'homme. Actuellement, un déclin des nouvelles infections à VIH et des décès liés au SIDA est observé. En particulier, la prévention des nouvelles infections chez les enfants a progressé avec une baisse de 24% du nombre d'enfants nouvellement infectés par le VIH entre 2009 et 2011. De plus, il a été estimé qu'en 2011, 56% des personnes éligibles bénéficiaient des traitement pour VIH en Afrique subsaharienne (moyenne mondiale de 54%) (ONUSIDA 2012).

Après l'Afrique subsaharienne, les **Caraïbes** sont l'une des régions les plus durement touchées par l'épidémie de VIH avec 1 % des adultes vivait avec le VIH en 2011. Les rapports sexuels non protégés entre hommes et femmes - en particulier les rapports tarifés - sont considérés comme étant le principal mode de transmission du VIH dans les Caraïbes. (ONUSIDA 2012).

Ainsi, la transmission hétérosexuelle est devenu le mode de transmission majeur du VIH (80% des nouvelles infections). Si dans les pays développés l'usage du préservatif est globalement bien ancré dans les mœurs de la population, dans d'autres pays les coutumes et le prix du préservatif freinent l'utilisation de celui-ci et permettent ainsi de nouvelles infections. De part ces coutumes et leur physiologie vaginale, les femmes sont donc particulièrement exposées à l'infection par le VIH.

Du fait de l'importance majeur de la transmission hétérosexuelle, une des stratégies vaccinales s'orientent vers l'induction d'une réponse immune au niveau des muqueuses afin de prévenir l'infection des premières cellules cibles et la dissémination du virus dans l'organisme.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Généralités sur le VIH

1. Découverte du VIH et Histoire du SIDA

Cela fait plus de 30 ans que les premiers cas reconnus de Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) ont été signalés. En 1981, le *Center for Disease Control and Prevention* américain (Centers for Disease, 1981a, b) suggérait l'apparition d'une nouvelle maladie infectieuse. A New York et en Californie, des jeunes hommes homosexuels avaient soudainement développé des infections opportunistes rares (pneumonies à *Pneumocystis carinii* et sarcomes de Kaposi) qui semblaient résistantes à tout traitement. A cette époque, l'agent causal du SIDA n'était pas encore identifié mais, à l'aide de recherches immunologiques, de premiers indices ont été trouvés dont, notamment, la diminution rapide du taux de lymphocytes T CD4⁺ rendant les patients vulnérables aux infections opportunistes et à diverses tumeurs lorsque passant sous le seuil de 200 cellules/mm³. Ces premiers indices ont conduit les chercheurs à attribuer l'origine du SIDA au HTLV-I (*Human T-lymphotropic virus type I*), premier rétrovirus humain ayant été isolé un an auparavant et ciblant également les cellules T (Poiesz et al., 1980).

La première découverte de l'agent causal du SIDA par Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi et leurs collègues à l'Institut Pasteur remonte à 1983. Ils ont rapporté l'isolement d'un nouveau rétrovirus humain à partir d'une biopsie ganglionnaire d'un jeune homme homosexuel atteint du syndrome de lymphadénopathie (Barré-Sinoussi et al., 1983). Par microscopie électronique, ce nouveau virus apparaissait différent du HTLV-1 et a été nommé *Lymphadenopathie Associated Virus*. Environ un an plus tard, Robert Gallo et ses collègues du *National Institutes of Health* démontraient sans équivoque que ce virus était l'agent causal du SIDA et l'appelèrent HTLV-III (Popovic et al., 1984). Indépendamment, Jay Levy et ses collègues de l'Université de Californie, ont également isolé ce nouveau rétrovirus, qu'ils ont appelé *AIDS-Associated Retrovirus* (Levy et al., 1984). Enfin, en 1986, le comité international de la taxonomie des virus a recommandé que ce pathogène, connus sous trois noms différents, soit appelé "Virus de l'Immunodéficience Humaine" (VIH) (Coffin et al., 1986).

Peu de temps après l'identification du VIH, la première mise en évidence du VIH-2 a été décrite en 1985. Le sérum de travailleuses du sexe au Sénégal a montré une plus forte réactivité croisée avec les antigènes du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) qu'avec ceux du VIH nouvellement découvert, indiquant l'exposition à un virus de type SIV (Barin et al., 1985). Le virus a ensuite été isolé et caractérisé chez des patients d'Afrique de l'Ouest (Guinée-Bissau et Cap-Vert) atteint du SIDA et fut appelé LAV-2 (Clavel et al., 1986). Il a ensuite été rebaptisé VIH-2.

2. Structure du VIH-1, organisation génomique et cycle de réplication

2.1. Structure virale

La particule virale du VIH-1 (Figure 3) a une structure de forme sphérique d'environ 100 à 130 nm de diamètre. Elle est enveloppée par une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte dans laquelle les glycoprotéines virales d'enveloppe (Env) sont enchâssées: les glycoprotéines de surface (SU, gp120) et les glycoprotéines transmembranaires (TM, gp41) ayant des poids moléculaire de 120 et 41 kDa, respectivement. Les gp120 sont ancrées au virus par l'intermédiaire de liaisons non-covalentes les liant aux gp41. Une particule virale contient 10 à 14 trimères de gp120/gp41 (Mao et al., 2012). La bicouche lipidique contient également plusieurs protéines membranaires provenant de la cellule hôte, y compris les antigènes majeurs d'histocompatibilité, l'actine et l'ubiquitine.

Dans les particules matures, la protéine de matrice (MA, p17) est située sous la bicouche lipidique et associée à une enzyme virale, la protéase (PR, p10). La capside, conique, composée de la protéine de capside (CA, p24) contient l'ARN viral, ainsi que la protéine de nucléocapside (NC, p7) formant un complexe ribonucléoprotéique. Ce complexe renferme également des enzymes virales spécifiques: la transcriptase inverse (RT, p66/p51) et l'intégrase (IN, p32). Les protéines auxiliaires: Nef, Vif, Vpr sont présentes dans la particule virale. Trois protéines auxiliaires, Rev, Tat, et Vpu, ne sont pas empaquetées dans le virion.

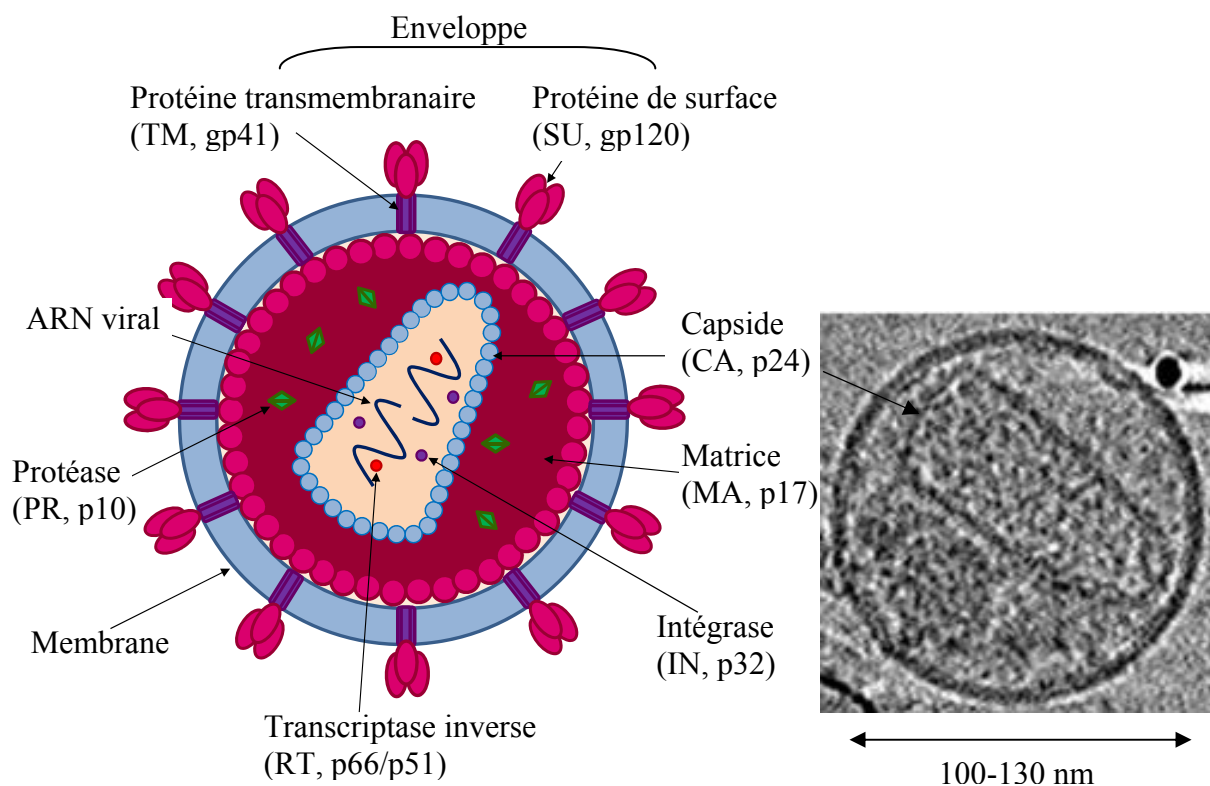


Figure 3. Particule virale de VIH-1 mature. A gauche, représentation schématique. A droite, particule virale observée par cryotomographie électronique (Ganser-Pornillos et al., 2008).

2.2. Organisation génomique

Le VIH a un génome d'environ 9 kb composé de 2 copies d'ARN simple brin de polarité positive. Ce génome est composé de 9 gènes alors que, par comparaison, celui de l'Homme en comprend 25 000 à 30 000.

Le génome du VIH-1 se compose de trois gènes structuraux, *gag* (pour *group-specific antigen*), *pol* (pour *polymerase*) et *env* (pour *envelope glycoproteins*), et est flanqué à chaque extrémité d'une séquence terminale répétée (LTR). Ces séquences contiennent les domaines indispensables à l'intégration du provirus dans le génome de la cellule cible et les séquences régulatrices de l'expression du génome viral. Le génome du VIH-1 code également pour des protéines de régulation (Tat, Rev), et des protéines auxiliaires (Vif, Vpr, Vpu et Nef), spécifique des lentivirus, dont le VIH fait parti. L'organisation du génome du VIH-1 ainsi que les fonctions des protéines qu'il code sont illustrées sur la figure 4.

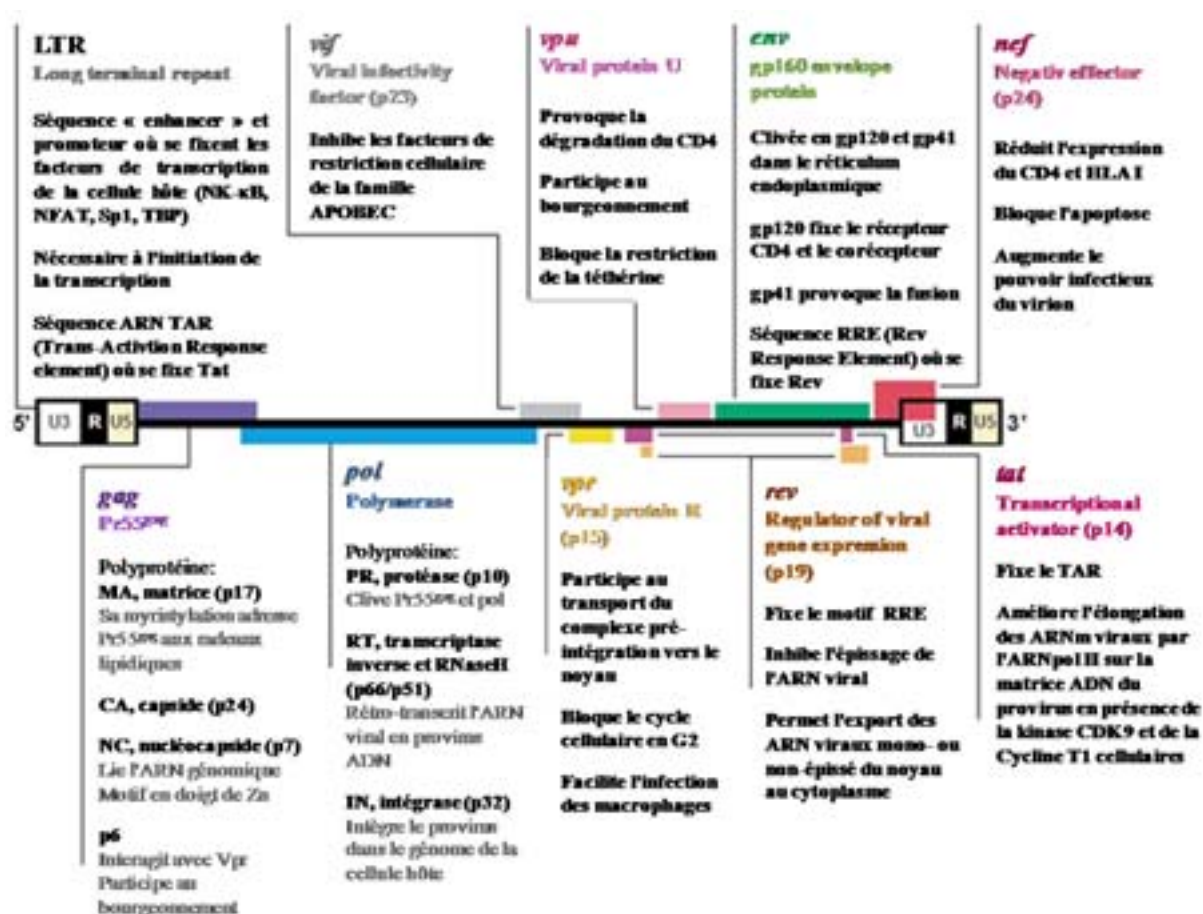


Figure 4. Organisation du génome d'environ 9 kb du provirus du VIH-1 et résumé des fonctions de ses 9 gènes codant pour 15 protéines (modifié d'après Greene and Peterlin, 2002).

2.3. Cycle de réplication

Le cycle de réplication du VIH-1 est représenté sur le figure 6.

2.3.1. Entrée du virus : attachement et fusion

L'entrée du VIH constitue la première étape dans le processus d'infection. L'attachement et la fusion du virus sont dépendantes de l'expression par la cellule cible du récepteur CD4 et d'un co-récepteur (CCR5 ou CXCR4). Le VIH infecte principalement les cellules T CD4⁺ du système immunitaire. La protéine CD4 est un membre de la superfamille des immunoglobulines et possède quatre domaines extracellulaires de type immunoglobuline (D1 à D4). Elle est exprimée à la surface cellulaire d'environ 60% des lymphocytes T, sur les lymphocytes T précurseurs dans la moelle osseuse et le thymus, sur les monocytes/macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques folliculaires et les cellules microgliales du système nerveux central.

Lors de la première étape de l'entrée virale, la glycoprotéine gp120 de l'enveloppe virale se lie au CD4 avec une affinité élevée (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Cela se traduit par des changements conformationnels de la gp120 exposant alors les sites de fixation au co-récepteur. Les co-récepteurs principaux impliqués dans l'entrée du VIH-1 sont le CCR5 et le CXCR4 (Alkhatib et al., 1996; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996), selon le tropisme viral (décrit au chapitre 2, paragraphe 1.1). L'interaction entre la gp120 et le CD4 conduit également à une diminution d'expression du CD4 à la surface de la cellule, ce qui rend les cellules infectées partiellement résistantes à de nouvelles infections (Piguet et al., 1999). Suite à la fixation de la gp120 aux co-récepteurs, des changements de conformation de la gp41 ont lieu, permettant l'exposition du peptide de fusion et ainsi la fusion des membranes virales et cellulaires (figure 5). Deux mécanismes différents d'entrée virale ont été mis en évidence: le virus peut pénétrer dans la cellule hôte soit par fusion directe avec la membrane cellulaire, indépendamment du pH, soit par endocytose dépendante de la clathrine suivie par la fusion avec la membrane de l'endosome (mécanisme minoritaire) (Checkley et al., 2011).

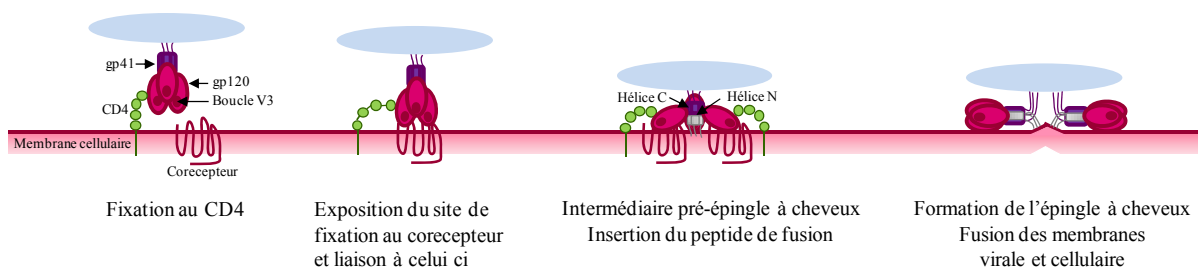


Figure 5. Représentation schématique des étapes précoces de la fusion du VIH-1 dans la cellule hôte.

2.3.2. Décapsidation et rétro-transcription

Suite à la fusion des membranes virales et cellulaires et à la décapsidation, le génome viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule. Un complexe viral nucléoprotéique de transcription

inverse est ainsi formé dans le cytoplasme (Fassati and Goff, 2001). Suite à la rétro-transcription du génome viral en ADN par la transcriptase inverse, le complexe de préintégration s'établit, protégeant ainsi l'ADN viral de la dégradation par des facteurs cellulaires comme APOBEC3 (voir chapitre 2, paragraphe 2.4) et facilitant son intégration dans le génome de la cellule hôte (Matreyek and Engelman, 2013).

La transcriptase inverse n'ayant pas d'activité correctrice, elle est peu fidèle et les erreurs de copie sont à l'origine de la variabilité génétique du VIH (voir chapitre 1, paragraphe 3.1.).

2.3.3. Intégration et transcription

L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte est catalysée par l'intégrase virale qui clive des nucléotides aux extrémités de l'ADN viral et l'intègre au génome cellulaire (Greene and Peterlin, 2002). A la suite d'une activation cellulaire, l'ADN intégré, ou provirus, est transcrit en ARN messagers (ARNm) par l'ARN polymérase II cellulaire. Le provirus est une forme virale très stable et sa durée de vie est donc identique à celle de la cellule infectée. L'élongation du transcrit et le transport des ARNm dans le cytoplasme cellulaire sont contrôlés par les protéines de régulation codées respectivement par les gènes *tat* et *rev*. En effet, la liaison de la protéine Tat virale à la séquence régulatrice TAR (*Transactivation response element*) permet le recrutement de facteurs stimulant la transcription provirale (Peterlin and Trono, 2003), alors que la protéine Rev, de par sa liaison au RRE (*Rev Response Element*), permet l'export de l'ARNm viral vers le cytoplasme de la cellule (Greene and Peterlin, 2002).

2.3.4. Assemblage, bourgeonnement et maturation

La glycoprotéine Env du VIH est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux sous la forme d'une protéine précurseur Env, gp160. Ce précurseur est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi, où il est clivé par une protéase cellulaire (furine) pour donner les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 matures et glycosylées (Checkley et al., 2011) qui vont migrer et s'ancrer dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Les protéines de structure du virus (matrice, capsid et nucléocapsid) sont produites sous forme d'une polyprotéine nommée polyprécurseur Gag. Les enzymes virales sont produites elles aussi sous forme d'une polyprotéine appelée Gag-Pol (Matrice - Capsid - Nucléocapsid - Protéase - Transcriptase Inverse - Intégrase). Lorsqu'elles quittent le Golgi, les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont transportées vers la membrane cellulaire.

La polyprotéine Gag contient trois domaines importants pour l'assemblage: le **domaine M**, localisé dans la région MA (matrice) myristylée en N-terminale, ciblant Gag à la membrane; le **domaine I** pour "interactif", localisé dans la nucléocapsid, responsable de l'interaction entre les monomères de Gag (Ganser-Pornillos et al., 2008) et le **domaine L** (tardif), médiant le bourgeonnement de la particule virale grâce à un motif térapeptidique PTAP de la région p6 de Gag (Demirov and Freed, 2004; Demirov et al., 2002).

Les domaines MA de Gag et Gag-Pol interagissent avec la membrane, tandis que les ARN viraux sont capturés par les domaines NC (nucléocapsid) de Gag et Gag-Pol. Peu après la libération du virus de la membrane plasmique, la protéase virale clive les polyprotéines Gag et Gag-Pol pour générer les protéines Gag et Pol matures. En l'absence de cette maturation, la

protéine Gag du virion immature et non infectieux, est associée à la queue cytoplasmique CT (Cytoplasmique Tail) de la gp41, perturbant les changements conformationnels de l'Env et empêchant alors la fusion du virion immature (Joyner et al., 2011).

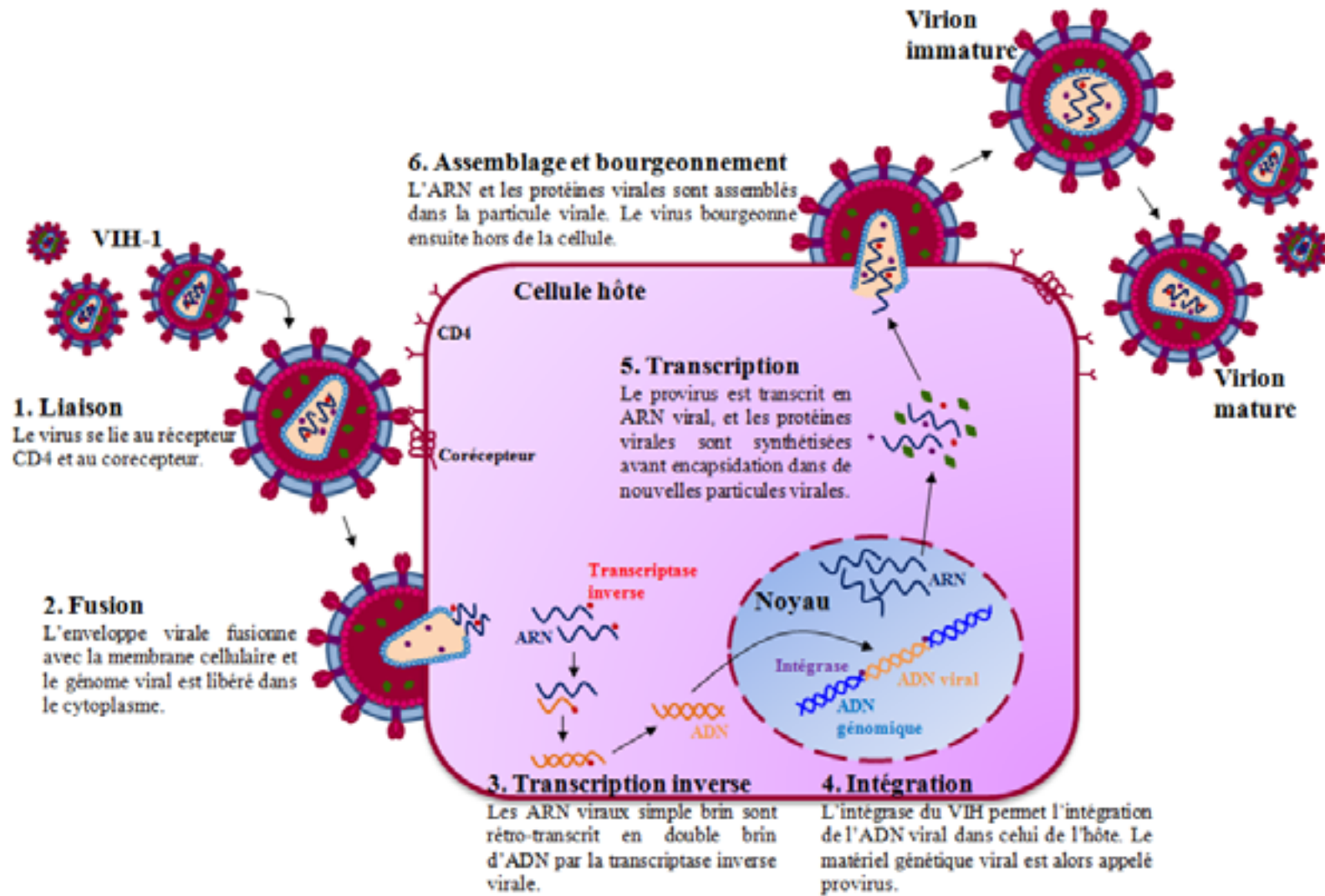


Figure 6. Cycle de réplication du VIH-1.

3. Variabilité génétique du VIH

3.1. Mécanismes de la variabilité génétique

La grande variabilité génétique et l'évolution rapide du VIH sont des facteurs importants dans la propagation du virus dans le monde. L'hétérogénéité génétique du VIH provient des taux de mutation et de recombinaisons élevés de la transcriptase inverse (1 à 10 mutation par génome viral et par cycle de réplication) associés à un fort taux de réplication du virus (10^9 à 10^{10} virions produits par jour). Il en résulte diverses populations génétiques d'espèces virales chez chaque patient infecté, appelées «quasi-espèces». Les quasi-espèces chez un individu infecté peuvent varier jusqu'à 10% (Hemelaar et al., 2006), les pressions de sélection exercées par le système immunitaire ou les antiviraux sélectionnent les variants résistants des virus mutés.

3.2. Classification du VIH

Le VIH est un membre du genre lentivirus de la famille des *Retroviridae*. Le nom lentivirus signifie "virus lent", l'induction des maladies par ces virus étant lente. Les lentivirus ont été détectés chez de nombreuses espèces de primates africains. Cependant, les primates du Nouveau Monde et asiatiques n'ont pas été décrits comme naturellement infectés par des lentivirus.

Il existe deux types de VIH, désignés VIH-1 et VIH-2, séparés en fonction de leurs propriétés sérologiques et de la séquence de leur génome. Le VIH-1 et le VIH-2 ont 40% à 50% d'homologie génétique, leur plus grande divergence se trouvant dans la séquence du gène *env*. Le VIH-1 est le résultat d'une transmission inter-espèces du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) infectant le chimpanzé (SIV_{cpz}) (Gao et al., 1999; Hahn et al., 2000; Keele et al., 2009; Peeters et al., 1989), tandis que le VIH-2 est plus étroitement lié à un virus infectant naturellement le singe sooty mangabey (SIV_{sm}) (Chen et al., 1997; Chen et al., 1996).

L'épidémie mondiale du SIDA est causée par le VIH-1. Le VIH-2 est concentré en Afrique occidentale et est rarement présent ailleurs.

Basé sur l'analyse phylogénétique de nombreuses souches de VIH-1 de diverses origines géographiques, le VIH-1 a été subdivisé en groupes, sous-types, sous-sous-types et formes recombinantes circulantes (CRF) ou formes recombinantes uniques. Un arbre phylogénétique représentant la diversité génétique du VIH est illustré à la figure 7.

3.2.1. Groupes M, N, O et P, et sous-types du VIH-1

Le VIH-1 peut être classé en quatre groupes: M (majeur), O (*outlier*), N (nouveau ou non-M, non-O) et P. La plupart des infections à VIH-1 dans le monde sont causées par des virus du groupe M, alors que les groupes O, N et P sont beaucoup moins fréquents.

Le groupe M a été classé en 9 sous-types désignés par les lettres, principalement dans l'ordre de leur découverte, A à K (pas de sous-types E et I). Les sous-types A et F sont subdivisés en sous-sous-types, notés par des chiffres, comprenant les sous-types A1 à A3 et le sous-type A4 plus récemment identifié (Vidal et al., 2006), ainsi que les sous-sous-types F1, F2.

Le groupe O est endémique au Cameroun et dans les pays voisins de l'Ouest de l'Afrique centrale. Cependant, même dans ces pays, le virus représente une minorité des souches de VIH-1 avec une prévalence de moins de 10% des infections à VIH-1 au Cameroun (Yamaguchi et al., 2004). Il s'est répandu en Europe où sa prévalence est encore très faible (Barin et al., 2007; Charneau et al., 1994; Peeters et al., 1995).

Des recombinants inter-groupes ont été signalés au Cameroun (Peeters et al., 1999; Takehisa et al., 1999) malgré le degré élevé de divergence entre les virus des groupes M et O. Les virus recombinants M/O peuvent se répliquer *in vivo* et *in vitro*, et même devenir le variant prédominant au sein de la population virale du patient (Peeters et al., 1999).

Le groupe N a également été identifié chez des patients camerounais mais il n'est représenté que par un nombre limité d'isolats (Ayoubu et al., 2000; Simon et al., 1998).

Le groupe P a été identifié en 2009 chez une patiente également camerounaise. Contrairement aux virus des groupes M, N et O qui sont proches du SIV infectant le chimpanzé (SIV_{cpz}), ce groupe est proche du SIV infectant le gorille (SIV_{gor}) (Plantier et al., 2009).

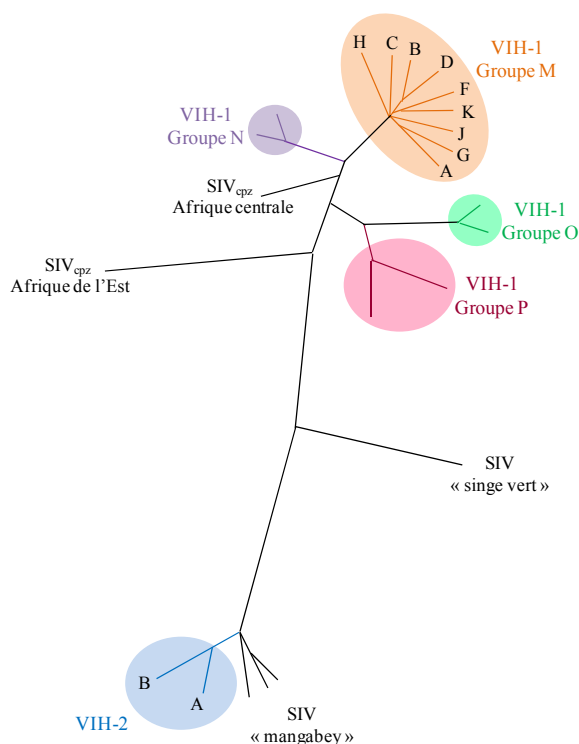


Figure 7. Diversité génétique du VIH.

Sont représentés les 4 groupes du VIH-1 (M, N, O et P), les 9 sous-types du groupe majeur M (A, B, C, D, F, G, H, J et K), les relations phylogénétiques avec le SIV de différents singes ainsi que celles avec le VIH-2 et deux de ses 8 sous-types majoritaires (adapté de (Plantier et al., 2009)).

Comme pour le VIH-1, des groupements phylogénétiques ont également été décrits pour le VIH-2. Actuellement huit groupes, désignés par les lettres A à H (les groupes A et B étant majoritaires), ont été rapportés (Damond et al., 2004).

La répartition géographique du VIH-2 est moins étendue que celle du VIH-1. Elle se limite principalement à l'Afrique occidentale, bien que la prévalence du VIH-2 est une préoccupation croissante dans certaines parties d'Europe et dans la région du Sud-Ouest de l'Inde. En Guinée-Bissau, une ancienne colonie portugaise, la prévalence du VIH-2 varie de 8 à 10% (Poulsen et al., 1989; Wilkins et al., 1993) et atteint 28% chez les travailleuses du sexe (Ghys et al., 1997; Langley et al., 1996). En plus de l'Afrique de l'Ouest, les pays ayant des

anciens liens socio-économiques avec le Portugal, incluant le Sud-Ouest de l'Inde, l'Angola, le Mozambique et le Brésil, ont un nombre significatif d'infection par le VIH-2 (Reeves and Doms, 2002). Le Portugal possède la plus forte prévalence d'infection par le VIH-2 en Europe, représentant environ 10-13% des infections à VIH et étant responsable de 4,5% des cas de SIDA (Soriano et al., 2000).

Bien que des cas de double infection par le VIH-1 et le VIH-2 aient été signalés, la recombinaison entre les deux types de VIH n'a pas encore été décrite (Curlin et al., 2004; Dirac et al., 2002).

3.2.2. Formes recombinantes circulantes (CFR)

Le séquençage des génomes du VIH a conduit à l'identification de recombinants inter-sous-types. Ils résultent de recombinaison entre sous-types chez un individu ayant de multiples infections à VIH de deux sous-types ou plus. Une nouvelle CFR est définie lorsque trois virus séquencés sur la totalité de leur génome présentent les mêmes points de recombinaison et sont isolés chez au moins trois patients sans lien épidémiologique entre eux (Robertson et al., 2000). Les CFR sont nommées avec un numéro séquentiel dans l'ordre dans lequel ils ont été rapportés dans la littérature suivi par les lettres des sous-types impliqués, la première étant la CRF01_AE. Si plus de deux sous-types sont impliqués, ils sont donc remplacés par la désignation "cpx", par exemple, CRF06_cpx (A, G, J, K).

A l'heure actuelle, 58 CFRs du VIH-1 (de CRF01_AE à CRF58_01B) et 1 CFR du VIH-2 (HIV-1 CRF01_AB) ont été définies et ont, pour la plupart, été décrites en Afrique. Certaines des CFR, telles que les CRF01_AE et CRF02_AG sont à l'origine d'épidémies régionales importantes.

3.3. Distribution globale des souches virales du VIH-1

Les sous types du VIH-1 sont inégalement répartis dans les différentes zones géographiques (figure 8). Selon des études récentes, les sous-types les plus répandus du VIH-1 sont les sous-types A, B et C (Hemelaar et al., 2006). Le sous-type C représente à lui seul 50% des infections à VIH-1 dans le monde, tandis que les sous-types A, B, D et G comptent pour 12%, 10%, 3% et 6%, respectivement. Les sous-types F, H, J et K représentent ensemble environ 1% des infections. Les CFR représentent 18% des infections à travers le monde, les CRF01_AE et CRF02_AG, responsables de 5% des cas, étant les plus représentées. Les virus de sous-type A sont prédominants dans les zones de l'Afrique centrale et orientale (Kenya, Rwanda, Ouganda et Tanzanie) et dans les pays d'Europe de l'Est constituant l'Union Soviétique (Taylor et al., 2008). Ceux du sous-type B, qui ont la répartition géographique la plus diffuse, sont prédominants en Amérique du Nord et latine, dans les Caraïbes, en Europe et en Australie. Ils sont également fréquents dans plusieurs pays d'Asie du Sud, d'Afrique du Nord, du Moyen-Orient (Israël), et chez les hommes homosexuels sud-africains et russes. Les virus du sous-type C sont majoritaires en Afrique du Sud, en Ethiopie et en Inde alors que ceux du sous-type D se trouvent principalement en Afrique orientale et, dans une moindre mesure, en Afrique de l'Ouest. La CRF01_AE et le sous-type B co-circulent en Asie du sud-

est alors que la CRF02_AG est dominante en Afrique centrale et Afrique de l'ouest. L'Afrique centrale abrite un mélange complexe de sous-types rares (F, G, H, J et K) sans aucune souche prédominante. Dans certaines régions du monde, moins d'informations sont disponibles à propos de la diffusion du VIH, en particulier en Asie centrale. La CRF01_AE est responsable de 84% des infections en Asie du sud-est et domine donc l'épidémie.

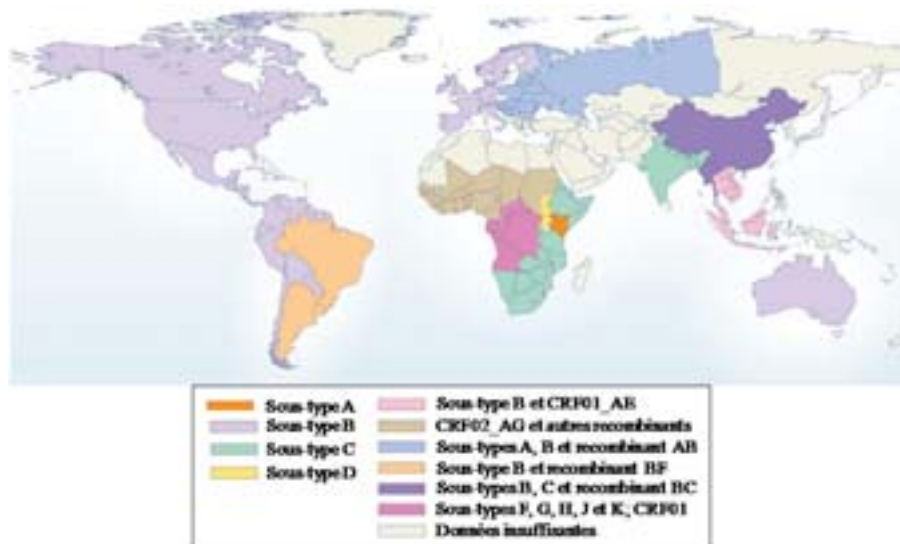


Figure 8. Distribution mondiale et diversité génétique des neuf sous-types principaux et des recombinants du VIH-1. *CRF: formes recombinantes circulantes* (modifié d'après Taylor et al., 2008).

4. Voies de transmission du VIH

Le VIH est transmis par contact direct avec du sang ou des sécrétions sexuelles contaminées.

4.1. Partage de seringues chez les consommateurs de drogues

Les consommateurs de drogues injectables ont un risque élevé d'exposition au VIH. En effet, le partage de matériel d'injection non stérilisé est un moyen à haut risques d'inoculer des infections transmissibles par le sang comme le VIH ou le virus de l'hépatite C. Ainsi, le risque de transmission du VIH par partage de seringue infectée est trois fois plus élevé que lors d'une transmission par voie sexuelle.

4.2. Transfusions sanguines et sang contaminé

Durant les années 90, de nombreuses personnes ont été infectées suite à des transfusions de sang contaminé par le VIH. Des procédures de contrôle du sang avant transfusion ont été mises en place et les infections à VIH par transfusion sanguine sont donc devenues extrêmement rares (OMS, 2010).

4.3. Contaminations accidentelles dans les milieux de santé

Les personnels de santé ainsi que les chercheurs peuvent, dans de rares cas, être infectés par le VIH lors d'une coupure ou d'une pique avec du matériel souillé ou lors d'une projection de sang infecté sur une muqueuse (les yeux, l'intérieur du nez) (Yeni, 2006).

4.4. Transmission de la mère à l'enfant

La transmission de la mère à l'enfant est la principale cause d'infection par le VIH chez les enfants et peut se faire à trois moments différents: au cours la grossesse (*in utero*), au moment de l'accouchement (*intrapartum*), ou après l'accouchement lors de l'allaitement. En l'absence de toute intervention, 35% à 49% des enfants nés de mères séropositives sont infectés avec environ 8% d'infection pendant la grossesse, 15% pendant le travail et l'accouchement, et 12% à 26% pendant l'allaitement (Koulinska et al., 2006; Leroy et al., 1998).

La majorité des transmissions du VIH de la mère à l'enfant *in utero* ont lieu durant le dernier trimestre de grossesse cependant, le mécanisme de transmission est encore mal compris.

La transmission *intrapartum* du VIH se fait par contact direct du nouveau-né avec des particules virales libres ou des cellules infectées du sang maternel et des sécrétions génitales lors du passage du vagin. Il a été montré par exemple que les premiers-nés de jumeaux ont un risque d'infection accru comparé au second jumeau (Duliège et al., 1995).

Les mécanismes de transmission du VIH-1 par allaitement ne sont pas encore bien compris. Le VIH pourrait, théoriquement, pénétrer dans la sous-muqueuse gastro-intestinale de l'enfant par une brèche dans l'épithélium. Comme la production d'acide gastrique chez le nouveau-né est réduite, plus de particules virales pourraient atteindre la muqueuse intestinale monostratifiée et infecter le nouveau-né (Meng et al., 2002).

La diminution du taux de transmission mère-enfant qui a été observée au cours de la dernière décennie est due à différents facteurs: les femmes séropositives enceintes sont étroitement suivies et reçoivent un traitement antirétroviral durant la grossesse et l'accouchement est réalisé par césarienne avant travail et rupture des membranes. Avec toutes ces précautions, le risque de transmission du VIH de la mère à l'enfant a été diminué à environ 1% dans les pays les plus développés (Tudor Car et al., 2011).

Récemment, le premier cas d'un enfant avec une charge virale indétectable suite à une infection par le VIH-1 *in utero* a été décrit aux États-Unis. La mère ne savait pas jusqu'à l'accouchement qu'elle était séropositive et n'avait donc pas bénéficié des traitements et du suivi nécessaires. Dans les trente premières heures suivant l'accouchement, après que l'infection du nouveau-né soit déclarée, le nourrisson a été placé sous thérapie antirétrovirale forte jusqu'à ses 18 mois alors qu'habituellement, les nouveaux nés sont traités à 6 semaines. La mère a ensuite stoppé le traitement de l'enfant pendant 5 mois au terme desquels l'enfant s'est révélé séronégatif. Cette absence de détection du virus est un espoir pour tous les futurs nouveau-nés séropositifs. En effet, dans le monde, surtout dans les pays en voie de développement, plus de 1000 bébés naissent contaminés chaque jour (Unicef, 2010).

4.5. Transmissions sexuelles

L'infection par voie sexuelle est le mode de transmission majeur du VIH.

Chez la femme, lors d'une infection par voie génitale, le virus doit traverser plusieurs barrières physico-chimiques, incluant le mucus cervico-vaginal ainsi que le faible pH intravaginal, avant d'infecter les cellules cibles de l'hôte (Miller et al., 2005; Quayle, 2002). Après liaison ou internalisation des virions dans les cellules dendritiques de la couche sub-épithéliale de la muqueuse vaginale, celles-ci migrent dans la sous-muqueuse ou dans les ganglions lymphatiques environnants. Les virions sont alors présentés aux lymphocytes T CD4⁺ qui seront ainsi infectés (Geijtenbeek et al., 2000; Gupta et al., 2002; Sugaya et al., 2004) et permettront la dissémination du virus dans l'organisme (figure 9). Parmi les défenses innées avec des activités antivirales du tractus génital féminin, le SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) (Fahey and Wira, 2002; McNeely et al., 1995), la lactoferrine (Berkhout et al., 2004), des défensines (Cole, 2006; Venkataraman et al., 2005) ou encore la chimiokine RANTES pouvant être associée à une protection anti-virale (Hirbod et al., 2006; Iqbal et al., 2005) ainsi que des barrières physiques, tels qu'un pH bas et un épithélium pluri-stratifié au niveau du vagin, sont autant d'obstacles à l'infection par le VIH (Coombs et al., 2003).

Les défenses immunitaires du tractus génital masculin ainsi que leur potentiel rôle dans l'infection par le VIH ont été beaucoup moins décrits que chez la femme. Il a néanmoins été mis en évidence la présence de facteurs inhibiteurs contribuant à une activité anti-VIH et diminuant donc la transmission du virus par voies sexuelles: 52 polypeptides cationiques (tels que le SLPI, les défensines et la lactoferrine agissant également comme défenses innées du tractus génital féminin) sont contenus dans le plasma séminal (Martellini et al., 2009), un puissant inhibiteur présent dans le plasma séminal empêche l'attachement du VIH-1 au DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) (Sabatté et al., 2007), des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH et du SIV ont également été décrit dans le sperme (Huang et al., 2006; Letvin et al., 1999; Quayle et al., 1998). Au contraire, la neutralisation du pH vaginal par le sperme après éjaculation, le renforcement de l'attachement du VIH aux cellules cibles par le SEVI (*Semen-derived Enhancer of Virus Infection*) contenu dans le sperme (Münch et al., 2007; Roan and Greene, 2007), l'opsonisation du VIH par le complément (Bouhlal et al., 2002) et l'induction de médiateurs pro-inflammatoires (COX-2, GM-CSF, IL-6, IL-2, IL-8, ...) (Doncel et al., 2011) sont des stimulateurs d'infectivité du VIH *in vitro* et sont favorables à la transmission du virus.

Le rectum est exposé à de grandes quantités de bactéries (dues aux matières fécales). Ainsi, les DCs de la *lamina propria* sont moins sensibles dans la détection d'antigènes étrangers survenant lors de rapports sexuels. Lors d'une infection par voie rectale, bien qu'il y ai du mucus dans le rectum jouant le rôle de barrière contre le VIH-1, le pH neutre du rectum représente un obstacle moindre au VIH contrairement au pH du vagin. En outre, les abrasions épithéliales survenant lors des relations anales et l'inflammation associée favorisent l'entrée en contact du VIH avec ses nombreuses cellules cibles qui se trouvent dans la *lamina propria* sous-jacente (Harman et al., 2013).

Bien que le VIH puisse être retrouvé dans la salive, sa transmission à travers la muqueuse orale est très rare. En effet, seuls 3 cas de transmission lors d'actes dentaires et 42 cas potentiellement dus à une transmission oro-génitale ont été rapportés depuis 1987 (Campo et al., 2006; Lü and Jacobson, 2007; Rothenberg et al., 1998). La salive sécrétée par les glandes salivaires contenant des immunoglobulines A (IgA) ainsi que des facteurs de l'immunité innée, tels que des lysosymes, des défensines, la thrombospondine et le SLPI, associée à la faible quantité de lymphocytes T CD4⁺ au niveau buccal, contribuent probablement à la réduction du risque de la transmission du VIH par la muqueuse orale. Des défensines de type β , capables d'inhiber la réplication des virus X4 et R5, sont exprimées uniquement au niveau de la muqueuse orale, lui conférant ainsi une protection contre le VIH (Weinberg et al., 2006). Néanmoins, des cellules dendritiques exprimant le DC-SIGN peuvent être retrouvées dans la muqueuse orale lorsque la *lamina propria* gingivale est inflammée, favorisant ainsi le risque d'infection par le VIH (Cutler and Jotwani, 2006).

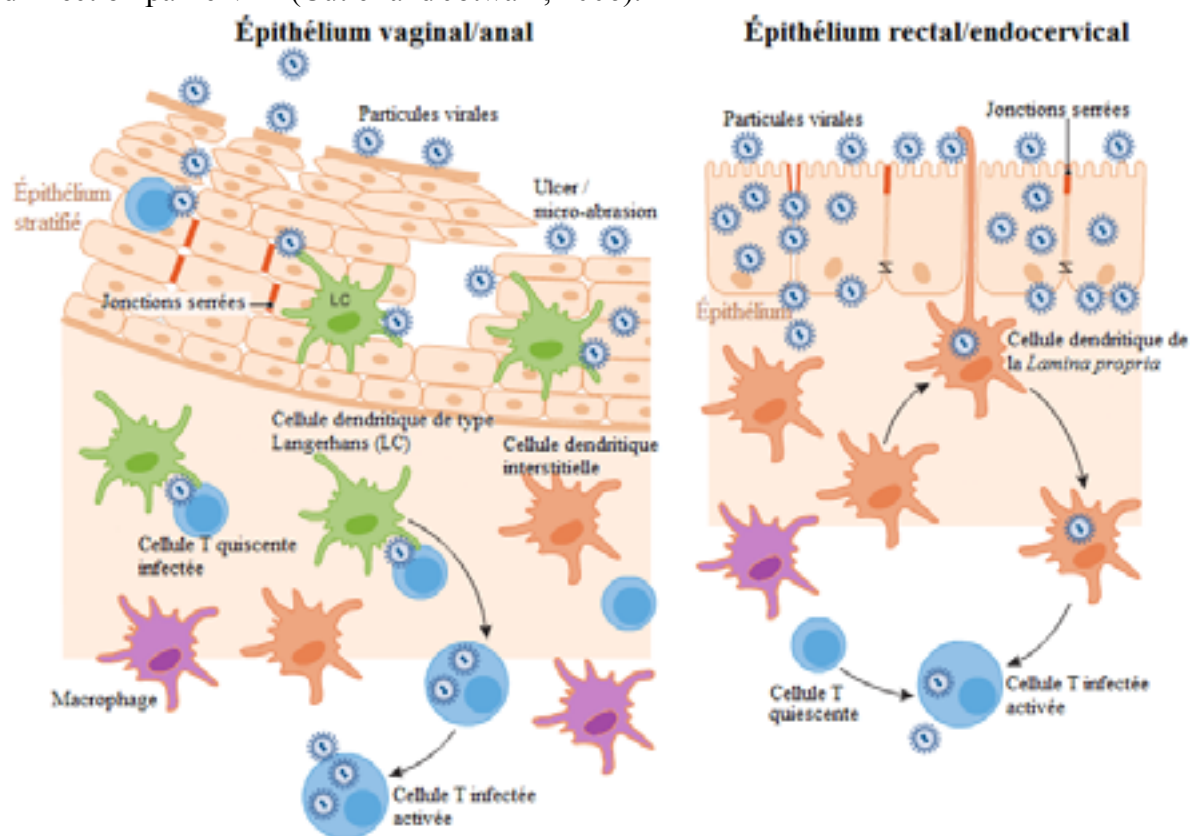


Figure 9. Voies de transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses sexuelles.

Pénétration du VIH-1 à travers l'épithélium malpighien vaginal/anal: le virus entre en contact avec les cellules dendritiques de type Langerhans (LCs) soit en passant entre les kératinocytes ou directement en passant par de micro-abrasions ou ulcères génitaux causés par les infections sexuellement transmissibles. Les LCs migrent ensuite vers la sous-muqueuse ou les ganglions lymphatiques et transfèrent le virus aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques interstitielles ainsi que les macrophages transfèrent également le VIH-1 aux cellules T. Pénétration du VIH-1 à travers l'épithélium rectal/endocervical: le virus pénètre à travers les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Le VIH-1 capturé et/ou répliqué par les cellules dendritiques de la *lamina propria* est alors transféré aux cellules T activées.

Alternativement, le VIH peut traverser l'épithélium par transcytose (modifié d'après (Cunningham et al., 2013)).

5. Chronologie de l'infection à VIH-1

L'évolution de l'infection à VIH-1 chez un individu non traité, représentée figure 10, se déroule en trois étapes:

La **primo-infection** (ou phase aiguë - 6 à 12 semaines), avec ou sans symptômes, est la période pendant laquelle le virus est le plus susceptible d'être transmis par l'individu infecté. En effet, elle est caractérisée par une forte augmentation de la charge virale dans le sang (jusqu'à plusieurs millions de particules virales par millilitre de sang) due à une réplication virale intense se stabilisant dans les semaines suivant l'infection. Cette réplication est accompagnée d'une chute significative du taux de lymphocytes T CD4⁺, cibles principales du virus. A la fin de la primo-infection s'établissent très rapidement les réservoirs viraux suite à l'infection des lymphocytes T CD4 mémoires (Eisele and Siliciano, 2012).

La **phase de latence clinique** (ou phase asymptomatique - 7 à 10 ans) correspond à la mise en place d'un équilibre entre les défenses immunitaires de l'hôte et la réplication du virus. Cela conduit à une réduction de la charge virale dans le sang et peut permettre un contrôle apparent du VIH jusqu'à plusieurs années suivant l'infection. Le renouvellement rapide de nouvelles particules de VIH circulantes (environ 10⁹/jour) résulte de la réplication constante du virus *in vivo* dans les tissus lymphoïdes. Cela a pour conséquence l'augmentation régulière de la charge virale observée au cours de l'évolution de l'infection (Ho et al., 1995) et donc la mort progressive des lymphocytes T CD4⁺ se régénérant jusqu'à épuisement du thymus (Fauci, 1996). La charge virale étant telle, un état cellulaire d'activation généralisée à l'origine des dysfonctions cellulaires et de la mort par apoptose des cellules est observé chez les individus infectés (Lederman et al., 2000). Dès lors, l'organisme entre dans la phase d'immunodéficience appelée SIDA.

Le **stade SIDA** est caractérisé par l'apparition de maladies infectieuses opportunistes, normalement rares chez les individus sains, conduisant au décès. La survenue de ces pathologies est directement liée au faible taux de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang.

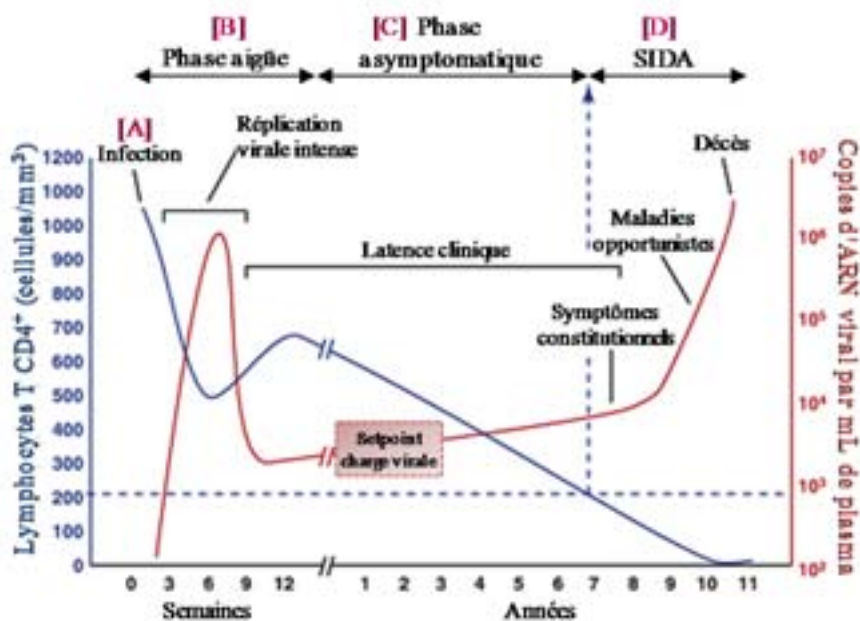


Figure 10. Évolution naturelle de l'infection par le VIH-1. [A] L'individu est infecté par le VIH-1. [B] Phase aiguë (6 à 12 semaines): pic de la charge virale accompagné d'une baisse du nombre de lymphocytes T CD4⁺. [C] Phase chronique asymptomatique (7 à 10 ans en moyenne): la réplication virale se stabilise à un seuil appelé "setpoint". [D] SIDA: augmentation de la réplication virale et chute de la quantité de cellules T CD4⁺ sous le seuil de 200 cellules/mm³ (adapté de (An and Winkler, 2010)).

6. Prévention et traitements actuels

6.1. Prévention

6.1.1. La circoncision

Le prépuce contient des lymphocytes T CD4⁺, des macrophages et des cellules de Langerhans. Et, bien que la surface de cette muqueuse soit petite, l'expression de ces cellules exprimant le CCR5 la rend susceptible à l'infection par le VIH (Donoval et al., 2006; McCoombe and Short, 2006; Patterson et al., 2002).

Outre la barrière mécanique qu'offrent les préservatifs, la circoncision est la manière la plus efficace d'empêcher l'infection sexuelle de l'homme par le VIH. En effet, cet acte chirurgical réduit de près de 60% la transmission VIH de la femme à l'homme (Auvert et al., 2005; Lissouba et al., 2011). Cependant, les mécanismes par lesquels la circoncision prévient l'infection ainsi que l'efficacité de la circoncision dans la prévention de la transmission du virus de l'homme à la femme restent mal connus. De plus, les effets de la circoncision peuvent être contrebalancés par une augmentation des comportements à risques, par exemple chez les homosexuels (Londish et al., 2010; Millett et al., 2008; Templeton et al., 2009). En 2007, la circoncision de l'adulte en tant que prévention additionnelle contre le virus est recommandée par l'OMS et l'ONUSIDA dans les communautés à forte prévalence de VIH (OMS/ONUSIDA, New Data on Male Circumcision and HIV Prevention, 2007).

6.1.2. Les microbicides

L'idée d'un produit microbicide a été proposée il y a plus de 20 ans par des spécialistes de la reproduction qui ont reconnu la nécessité de méthodes de prévention qui permettraient aux femmes de prévenir la transmission par le VIH. En effet, de par leur anatomie, les femmes sont jusqu'à huit fois plus susceptibles aux maladies sexuellement transmissibles, dont le VIH, que les hommes. Pour être efficace et toléré par les utilisatrices, le gel microbicide idéal devrait: ne pas affecter le pH du vagin, rester dans le vagin suffisamment longtemps pour réagir contre les maladies sexuellement transmissibles pendant et après la relation sexuelle, ne pas être onéreux, ne pas couler après application et enfin être compatible avec le préservatif masculin.

Un des premiers produits considéré a été le spermicide nonoxynol-9 (Richardson, 2002; Van Damme et al., 2002). Malheureusement, les études ont montré qu'il n'était ni sûr ni efficace contre le VIH. D'autres essais de microbicides de première génération ce sont également révélés infructueux. Ces produits étaient destinés à renforcer les défenses naturelles du vagin ou à créer une barrière pour protéger les cellules cibles dans le vagin.

La recherche s'oriente maintenant vers des produits de prévention contenant des antirétroviraux couramment utilisés dans le traitement du VIH. En effet, les antirétroviraux permettraient de prévenir la chute du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans la *lamina propria* et de ralentir la réplication virale. La réponse immune adaptative de l'hôte pourrait alors réagir contre l'infection comme cela a pu être montré dans un modèle de transmission rectale du SIV chez le singe (Cranage et al., 2008). Le plus étudié est un gel de ténofovir qui a été décrit dans l'étude CAPRISA 004 comme non toxique et efficace pour réduire le risque d'infection à VIH chez les femmes qui l'ont utilisé avant et après un rapport sexuel vaginal (Abdool Karim et al., 2010). Cependant, des résultats contraires ont été obtenus dans l'étude VOICE (Vaginal and Oral Interventions to Control the Epidemic) (Chan, 2012). Ce gel est actuellement évalué dans l'étude FACTS 001, un essai de phase III testant le même schéma que l'étude CAPRISA 004 (résultats prévus en 2014).

Des microbicides sous la forme d'anneaux vaginaux sont également en cours d'élaboration. Parce qu'ils peuvent être utilisés mensuellement, certaines femmes peuvent trouver que les anneaux répondent mieux à leurs besoins ou leurs modes de vie qu'un produit utilisé quotidiennement ou au moment des rapports sexuels. Deux essais à grande échelle sont prévus pour évaluer l'innocuité et l'efficacité d'un anneau vaginal contenant l'antirétroviral dapivirine.

6.1.3. La prophylaxie pré-exposition et les traitements en prévention

L'idée du traitement antirétroviral comme moyen de prévention de la transmission du VIH est assez ancienne, puisqu'il s'agit du principe au cœur de la prévention de la transmission de la mère à l'enfant. C'est néanmoins en 2008 qu'il est décrit que les personnes séropositives sous traitement antirétroviral efficace ne transmettaient plus le VIH par voie sexuelle (Pietro Vernazza, 2008). De cette étude a été créé la stratégie "treatment as prevention" (TasP) consistant à traiter par des antirétroviraux des personnes infectées par le VIH afin qu'ils diminuent leur charge virale et donc la transmission du virus à leur partenaire.

En 2011, l'essai clinique très probant HPTN 052, évaluant l'efficacité des TasP dans la prévention de la transmission sexuelle du VIH chez les couples sérodifférents, a montré une diminution de 96% de la transmission du VIH au partenaire séronégatif en Afrique (Cohen et al., 2011).

La prophylaxie pré-exposition (PrEP) est une nouvelle méthode de prévention du VIH dans laquelle les personnes séronégatives utilisent des antirétroviraux afin de réduire leur risque de contracter le virus. En 2010, l'étude iPrEx a révélé qu'une dose quotidienne orale de Truvada® (combinaison emtricitabine / fumarate de ténofovir disoproxil) offrait une réduction de 44% de l'incidence du VIH dans une population homosexuelle (Grant et al., 2010). En 2011, les essais Partners PreP et TDF2, ont démontré que la dose orale quotidienne de médicaments antirétroviraux utilisés pour traiter l'infection à VIH peut réduire de plus de 62% l'acquisition du VIH chez les adultes séronégatifs exposés au virus lors de rapports hétérosexuels. En Juillet 2012, la US Food and Drug Administration a approuvé le Truvada® en tant que PrEP chez les adultes sexuellement actifs à risque d'infection par le VIH.

6.2. Traitements

Le traitement ultime contre le VIH consisterait à éradiquer le virus de l'organisme complètement. A défaut, certains espèrent un "remède fonctionnel" permettant aux individus infectés de vivre avec le VIH sans avoir besoin d'un traitement antirétroviral. Les progrès des stratégies thérapeutiques antirétrovirales ont considérablement amélioré la survie et réduit l'incidence des maladies opportunistes et autres maladies liées à l'immunosuppression chez les personnes vivant avec le VIH. Toutefois, à ce jour, aucun des traitements disponibles ne permet d'éradiquer l'infection.

Les traitements antirétroviraux hautement actifs ont pour objectifs de réduire la charge virale, de limiter la production de nouvelles particules virales et l'infection de nouvelles cellules ainsi que de restaurer l'immunité des individus infectés.

Chaque classe de médicament antirétroviral est dirigé contre une étape du cycle viral (figure 11):

- **Inhibiteurs du CCR5 (vicriviroc en essais, maraviroc):** inhibent de manière non compétitive la fixation du VIH sur son principal co-récepteur d'entrée dans la cellule, le CCR5. Le tropisme des souches virales présentes chez l'individu infecté doit être déterminé avant d'être traité par ces inhibiteurs. En effet, les patients ayant des souches virales X4 ne pourront pas avoir accès à cette thérapeutique.
- **Inhibiteur de fusion:** L'enfuvirtide (peptide T20) se lie compétitivement à la gp41 du VIH inhibant ainsi la fusion des membranes virales et cellulaires.
- **Inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques de la transcriptase inverse (lamivudine, abacavir, stavudine, zinovudine / ténofovir):** première classe d'antirétroviraux mis sur le marché avec la commercialisation de la zidovudine dès 1987. Ils sont dérivés des nucléosides/nucléotides naturels avec lesquels ils sont en compétition pour leur activité sur la transcriptase inverse virale.

- **Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (efavirenz, névirapine, dapivirine):** inhibent la transcription inverse en se fixant à la transcriptase inverse de façon non compétitive.
- **Inhibiteurs de l'intégrase (dolutégravir en essais, raltégravir, elvitégravir):** bloquent l'action de l'intégrase et ainsi l'insertion de l'ADN viral au sein de l'ADN cellulaire hôte. L'ADN viral persiste alors de manière circulaire dans la cellule infectée.
- **Inhibiteurs de protéase (indinavir, ritonavir, lopinavir):** se lient compétitivement au site actif de la protéase et interfèrent donc avec la maturation des protéines virales nouvellement synthétisées.

Un inhibiteur de la maturation virale, le bevirimat, a été testé mais son développement a été suspendu. En effet, le bevirimat s'est révélé peu biodisponible (difficulté à diffuser correctement dans l'organisme). De plus, sa réponse antivirale était assez faible notamment chez ceux ayant un virus résistant aux inhibiteurs de la protéase (la résistance aux inhibiteurs de la protéase réduit l'efficacité du bevirimat dans au moins 40 % des cas). Le bevirimat inhibe la maturation du virion immature en se fixant sur Pr55Gag et en empêchant ou retardant ainsi le clivage des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol, contrairement aux inhibiteurs de protéases qui inhibent le site actif de la protéase virale (Wainberg and Albert, 2010).

A l'heure actuelle, la norme pour toute personne sous HAART est l'utilisation de médicaments avec au moins deux mécanismes d'action différents (par exemple, deux INTI et un INNTI ou un inhibiteur de protéase). En effet, au court du temps, le VIH peut subir des mutations qui le rendent résistant aux médicaments. En ciblant plusieurs étapes dans le cycle viral en même temps, l'émergence de la résistance peut être ralentie ou empêchée.

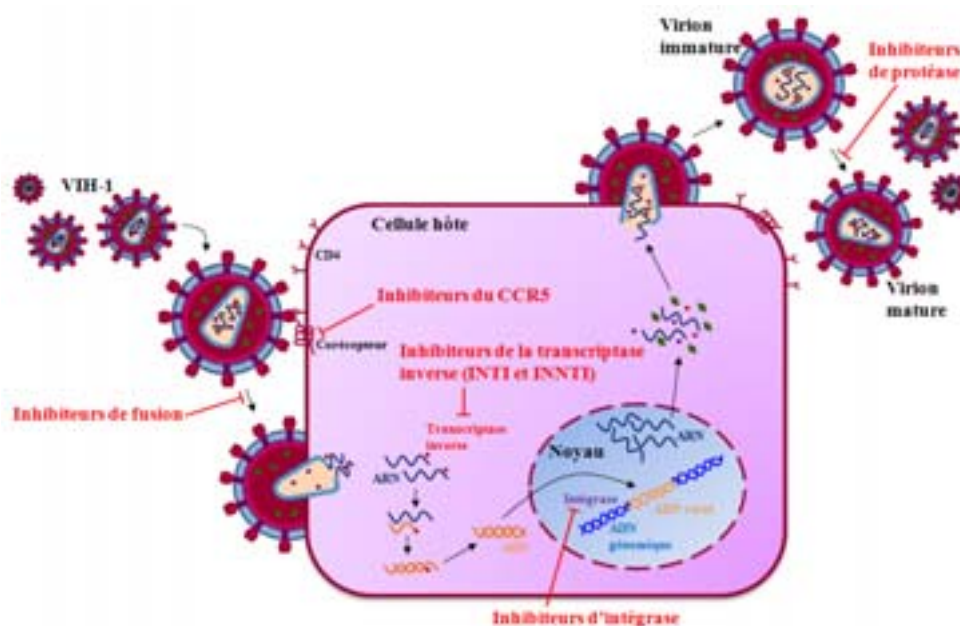


Figure 11. Action des antirétroviraux disponibles pour le traitement de l'infection à VIH en fonction de leur mode d'action au cours du cycle viral.

Chapitre 2 : Physio- et immuno-pathologies de l'infection par le VIH-1

1. VIH et cellules cibles: les cellules de l'immunité en ligne de mire

En raison de la forte affinité entre la gp120 virale et la molécule CD4, les lymphocytes T CD4⁺ représentent la cible privilégiée du VIH (Figure 12). La chute des défenses immunitaires des individus infectés par le VIH est associée à la diminution du taux de lymphocytes T CD4⁺. D'autres cellules, dites présentatrices d'antigènes, peuvent également être infectées par le VIH tels que les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les cellules microgliales. Dans d'autres cellules, le VIH peut entrer dans la cellule, s'intégrer dans le génome de l'hôte mais ne s'y réplique pas, résultant alors en un réservoir de virus infectieux sur le long-terme (Smith et al., 2001). Enfin, d'autres cellules cibles du VIH, minoritaires, tels que les lymphocytes B (Belmonte et al., 2006) ou les cellules NK, n'ont pas de rôle significatif dans la persistance du réservoir viral latent mais sont importants dans l'établissement de l'infection aux stades précoces.

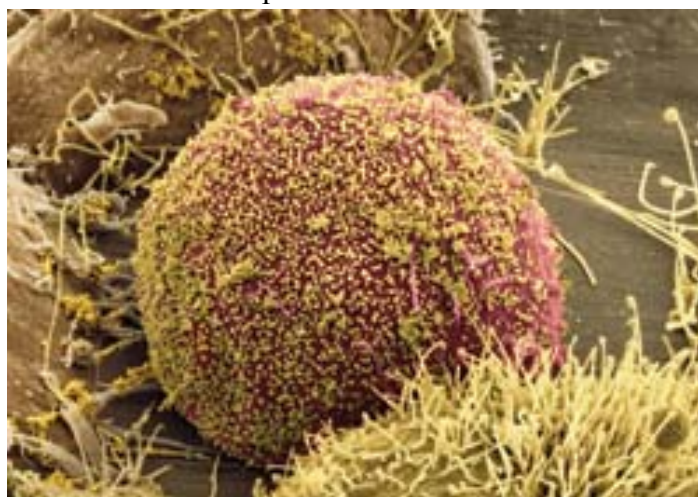


Figure 12. Photographie de microscopie électronique montrant les particules de VIH (en jaune) à la surface d'un lymphocyte T CD4⁺ infecté (en violet). Cette image est colorée artificiellement (Thomas Deerinck, NCMIR/Photo Researchers, Inc).

1.1. Co-récepteurs du VIH-1 et tropisme

Le premier co-récepteur du VIH-1 a été identifié par clonage fonctionnel d'un ADN complémentaire d'un co-facteur de fusion en 1996 et nommé fusine, car il intervenait dans la fusion du VIH-1 (Feng et al., 1996). Il a été démontré que la co-expression du CD4 et de la fusine à la surface de cellules non humaines les rendait permissives à la fusion et à l'infection par le VIH-1. La fusion et l'infection des lymphocytes T CD4⁺ primaires étaient également inhibées lors de l'utilisation d'un anticorps anti-fusine. Toutefois, la fusion médiée par la fusine était spécifique des souches T-tropique de VIH-1 (isolats ayant un fort pouvoir infectieux pour les lignées de cellules T CD4⁺ mais un faible pouvoir infectieux pour les

macrophages primaires et induisant généralement des syncytia), mais pas M-tropiques (isolats de VIH-1 infectant les macrophages primaires beaucoup plus efficacement que les lignées de cellules T et n'induisant pas de syncytia). La découverte de la fusine a été rapidement suivie par sa caractérisation comme récepteur de chimiokines (CXCL12, SDF-1 α et SDF-1 β) (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996) et, de ce fait, la fusine a été nommée CXCR4.

Le blocage de l'infection par le VIH-1 M-tropique par les β -chimiokines (RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β), ligands naturels du CCR5, a permis d'identifier le second co-récepteur du VIH-1 (Blanpain et al., 1999; Ogilvie et al., 2001).

Après l'identification des co-récepteurs CCR5 et CXCR4, il est devenu clair que les phénotypes M-tropique et T-tropique étaient liés à l'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre co-récepteur pour l'entrée du VIH-1. Les virus M-tropiques utilisent préférentiellement le CCR5, alors que les virus T-tropiques utilisent le CXCR4. Les virus utilisant le co-récepteur CCR5 ont été nommés virus R5, ceux utilisant le CXCR4, virus X4 et ceux capable d'utiliser les deux co-récepteurs, virus R5X4 (*dual-tropic* ou D-tropique). A un moment "t" et chez un patient donné la population virale peut contenir un mélange hétérogène des trois classes de virus. L'utilisation des co-récepteurs du VIH-1 et le tropisme sont résumés dans la figure 13. L'utilisation du CCR5 est prédominante dans les premiers stades de l'infection et persiste pendant toute la durée de la maladie. Chez environ 50% des patients symptomatiques, des virus capable de fixer le CXCR4 émergent avant la déclaration du stade SIDA. Cependant le mécanisme de l'évolution virale vers un tropisme CXCR4 n'est pas encore entièrement compris. Différentes pressions sélectives pourraient jouer un rôle dans l'émergence des variants CXCR4 telles que les réponses des anticorps neutralisants et des cellules T cytotoxiques dirigées contre la protéine Env du virus, la disponibilité des cellules cibles, les taux de chimiokines plasmatiques et d'expression des co-récepteurs (Edo-Matas et al., 2011).

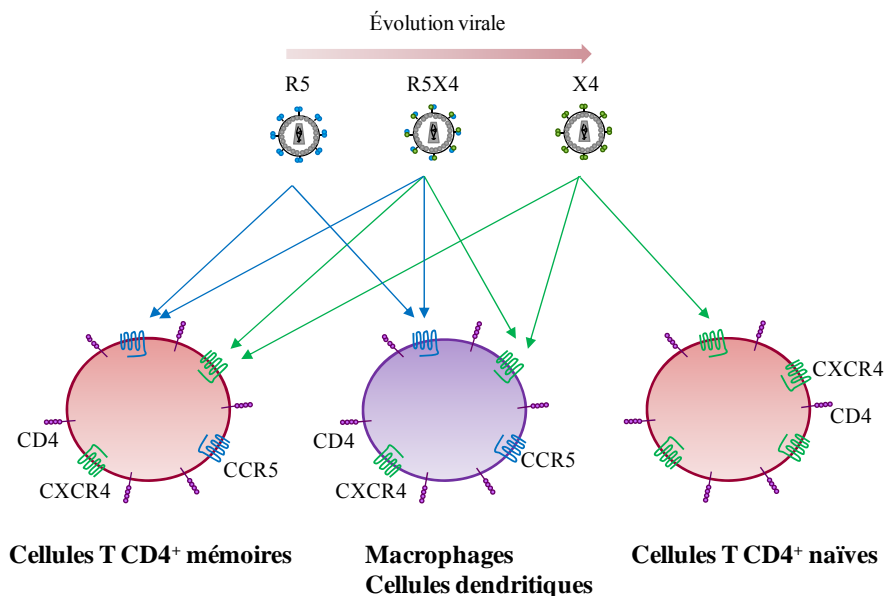


Figure 13. Modèle d'utilisation des corécepteurs et tropisme du VIH-1.

1.2. Lymphocytes T CD4⁺

Les cellules T CD4⁺ jouent un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire (Zhu and Paul, 2008). Elle permettent l'activation optimale (intensité et longévité) des lymphocytes CD8⁺ qui lysent les cellules infectées (Thèze et al., 2011). Les lymphocytes T CD4⁺ sont également capable d'aider à la génération d'anticorps par les cellules B, de recruter et d'activer les macrophages ainsi que de recruter les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles au niveau des sites d'infection et d'inflammation.

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs circulent dans les ganglions lymphatiques. A la suite d'une présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient et migrent vers les sites d'inflammation sous l'influence de chimiokines. Ces lymphocytes T activés persistent ensuite sous forme de cellules T CD4⁺ mémoires.

Les lymphocytes T CD4⁺ activés expriment le CCR5 et le CXCR4 et représentent ainsi des cibles pour le VIH (Ostrowski et al., 1999). Le CCR5 est exprimé principalement par les lymphocytes T CD4⁺ mémoires alors que le CXCR4 est exprimé à la surface des cellules T CD4⁺ mémoires et naïves (Bleul et al., 1997). Du fait de leur durée de vie, les cellules CD4⁺ mémoires constituent le réservoir idéal pour la persistance à long terme du génome viral.

1.3. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes jouant un rôle essentiel dans l'induction des réponses immunitaires et se différencient majoritairement à partir de monocytes sous l'action de cytokines spécifiques. Elles font le lien entre les réponses immunitaires innées et adaptatives de par leur capacité à endocyter et dégrader les pathogènes et à présenter les fragments d'antigènes aux cellules T par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Sous l'activation par des micro-organismes ou des signaux inflammatoires, les DCs immatures migrent vers les ganglions lymphatiques. Elles y présentent alors les antigènes du pathogène aux cellules T CD4 naïves ou aux cellules T CD8 par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ou I (CMH II ou I) respectivement, les cellules T reconnaissant le complexe CMH/antigène *via* leur récepteur des cellules T. Le complexe de molécules interagissant entre la cellule dendritique et la cellule T est appelé "la synapse immunologique" (Bromley et al., 2001).

Deux principaux sous-types de DCs ont été décrits: les DCs myéloïdes (cellules dendritiques de Langerhans et interstitielles, DCs circulantes, DCs folliculaires) et les DCs plasmacytoïdes. La durée de vie des DCs est très dépendante de leur localisation anatomique et du sous-type et est généralement comprise entre quelques jours et quelques semaines (Merad and Manz, 2009). Il a été montré que la réplication productive du VIH-1 a lieu dans les DCs dérivées de monocytes (MoDCs) pendant 45 jours (Popov et al., 2005). Du fait de leur stimulation par les cytokines dans les ganglions lymphatiques, les DCs peuvent y survivre plus longtemps, favorisant ainsi la propagation de l'infection virale et l'établissement de réservoirs viraux.

Deux types de cellules dendritiques myéloïdes présentes au niveau des muqueuses peuvent être distingués: les cellules dendritiques de Langerhans (LCs) stimulant la réponse T et les cellules dendritiques interstitielles (IDCs) stimulant la réponse B.

Les cellules de Langerhans (LCs) présentes à l'état immature au niveau de l'épithélium des muqueuses se caractérisent par des structures intracellulaires formées par une double membrane : les granules de Birbeck. Elles expriment le CD1a, l'E-cadhérine, le récepteur CD4 ainsi que le CD32. Les LCs expriment également une lectine de type C, la langerine (CD207) qui leur est spécifique. La langerine est un récepteur d'endocytose impliqué dans la formation des granules de Birbeck (Bechetoille et al., 2006).

Les cellules dendritiques interstitielles (IDCs) sont quant à elles localisées au niveau des sous-muqueuses, à proximité des LCs, et expriment en plus du CD4, le récepteur au mannose (CD206).

1.4. Macrophages

Les macrophages sont des cellules différenciées, ne se divisant plus, dérivées de monocytes circulants et représentent une population de phagocytes que l'on trouve sous différents noms dans différents tissus (tels que les microglies dans le cerveau, les macrophages alvéolaires des poumons ou les cellules de Kupffer dans le foie) (Gordon and Taylor, 2005; Murray and Wynn, 2011).

Ils jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée et adaptative en phagocytant les débris cellulaires et les pathogènes ainsi qu'en agissant en tant que cellules présentatrices d'antigène, déclenchant des réponses anticorps par la présentation de peptides dérivés de pathogènes aux cellules T CD4⁺ par la voie du CMH-II (Gordon and Taylor, 2005; Murray and Wynn, 2011) et l'activation de cellules T CD8⁺ cytotoxique (CTL) par la présentation croisée d'antigènes, dont ceux du VIH-1 (Ackerman and Cresswell, 2004).

1.5. Autres cellules cibles

1.5.1. Lymphocytes T CD8⁺

Suite à une rencontre antigénique les cellules T CD8⁺ prolifèrent et agissent sur l'activité antivirale. L'infection des lymphocytes T CD8⁺ est très faible et a lieu lors de leur phase de maturation dans le thymus quand elles co-expriment les molécules de CD4 et CD8. Les lymphocytes T CD8⁺ sont activés lors de la primo-infection et subissent des modifications fonctionnelles et phénotypiques afin de se différencier en cellules effectrices et de remplir leur fonction antivirale (Kaech et al., 2002). Lors d'une infection chronique à VIH, le système immunitaire ne parvient pas à contenir la réplication virale et la présence continue de l'antigène conduit à une activation immunitaire persistante (Appay et al., 2002; Champagne et al., 2001). Les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du VIH ont de faibles taux d'expression de la perforine et une activité cytolytique réduite comparée à celle des cellules T CD8⁺ spécifiques du cytomégalovirus. Chez les non-progressseurs à long terme (voir chapitre 2, paragraphe 2.), l'expression de la perforine ainsi que la forte prolifération des lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle protecteur dans l'infection (Migueles et al., 2002), alors que les patients qui progressent vers la maladie ont des cellules T CD8⁺ spécifiques du VIH qui ont perdu leur capacité de prolifération.

1.5.2. Lymphocytes B

Les lymphocytes B, produits dans la moelle osseuse, sont des composants essentiels du système immunitaire, en particulier de l'immunité humorale décrite dans le chapitre 2, paragraphe 3.1.2.2. Ils expriment à leur surface le récepteur des cellules B leur permettant de se lier à un antigène spécifique. Une fois celui-ci lié, le lymphocyte B se différencie en plasmocyte sécrétant des anticorps ou en cellule B mémoire.

Bien que l'infection des lymphocytes B n'ait pas été décrite *in vivo*, certaines équipes ont démontré une infection des cellules B *in vitro* (Belmonte et al., 2006; Rappocciolo et al., 2006) ainsi qu'un transfert du virus de ces cellules aux lymphocytes T CD4 (Rappocciolo et al., 2006).

1.5.3. Cellules "Natural Killer" (NK)

Les cellules NK sont des lymphocytes très peu infectés par le VIH jouant un rôle crucial dans la défense immunitaire innée contre certaines tumeurs et divers virus, parasites, champignons et bactéries. Elles constituent environ 15% des lymphocytes du sang périphérique et se retrouvent également dans le foie, le péritoine et le placenta. En tant que composant du système immunitaire innée et spécifique, les cellules NK pourraient avoir un rôle important dans la défense de l'hôte contre l'infection par le VIH, ainsi que dans le contrôle de la réplication du virus *in vivo*. Des études ont démontré que les cellules NK contribuent à la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par le VIH par des mécanismes cytolytiques et non cytolytiques. Les cellules NK peuvent:

- lyser, soit directement, soit par l'intermédiaire de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, voir chapitre 2, paragraphe 3.2.1.3.2.) et ainsi avoir un rôle protecteur dans les premiers stades de l'infection à VIH (Fauci et al., 2005).
- supprimer la réplication du VIH *in vitro* par contact cellule-cellule et en inhibant l'entrée du virus dépendante du CCR5 par la production de facteurs solubles (CCL3, CCL4 et CCL5) (Fauci et al., 2005).

2. Résistance à l'infection et à la progression

En fonction des individus, il existe une hétérogénéité considérable dans le contrôle du virus et la vitesse de progression de la maladie qui n'est pas entièrement expliquée par des facteurs environnementaux ou viraux. La réponse de certains patients infectés s'écarte de celle attendue après une exposition au VIH: **[A]** les individus fréquemment exposés mais non-infectés (*Highly Exposed, Persistently Seronegative* ou HEPS) peuvent présenter une résistance à l'infection par le VIH même après plusieurs expositions à haut risque (Dean et al., 1996; Hütter et al., 2009; O'Brien and Nelson, 2004; Shacklett, 2006), **[B]** les non progresseurs à long terme (*long-term non-progressors* ou LTNP) maintiennent leur taux de cellules T CD4⁺ et ont une charge virale faible pendant plus de dix ans, **[C]** les progresseurs rapides qui ne peuvent contrôler la virémie et développent le SIDA dans les trois ans suivant l'infection (O'Brien and Nelson, 2004) et **[D]** les contrôleurs élites, représentant seulement 1%

des personnes infectées par le VIH, qui ont une virémie inférieure à 50 copies d'ARN/mL et donc indétectable (Walker, 2007). Cependant, les mécanismes immunitaires responsables de ces absences ou contrôles d'infection sont multiples et ne sont que partiellement élucidés.

2.1. Mutation du co-récepteur CCR5

Une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant pour le co-récepteur CCR5 (CCR5 Δ 32) résulte en une protéine CCR5 tronquée n'étant pas exprimée à la surface des cellules (Dean et al., 1996; Ioannidis et al., 2001) et empêchant de ce fait une infection par le VIH-1 de tropisme R5. Seulement 1% des Européens du Nord sont homozygotes pour le CCR5 Δ 32 et bénéficient ainsi d'une protection contre l'infection à VIH (Ioannidis et al., 2001). Bien que l'hétérozygotie CCR5 Δ 32 n'empêche pas l'infection, celle-ci progresse néanmoins moins rapidement chez les individus traités ou non (Dean et al., 1996), cet effet protecteur étant particulièrement fort chez les personnes sous traitement antirétroviral (Hendrickson et al., 2008). Une variation génétique dans la région promotrice ainsi que d'autres mutations du CCR5 peuvent, au contraire, accélérer la progression de la maladie (Piacentini et al., 2009). A ce jour, la mutation CCR5 Δ 32 est la seule connue comme bloquant l'infection par le VIH R5 chez l'Homme.

En 2006, un patient, couramment appelé "le patient de Berlin", atteint de leucémie aiguë myéloblastique et infecté par le VIH a reçu une greffe de moelle osseuse d'un donneur homozygote pour le CCR5 Δ 32. Vingt mois après la greffe et en absence de traitement, la charge virale du transplanté restait indétectable (Hütter et al., 2009).

2.2. Polymorphisme des gènes HLA

Chez l'Homme, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) permettant la présentation des antigènes aux lymphocytes T est appelé HLA (Human Leukocyte Antigen). Les gènes HLA-A, -B et -C correspondent au CMH de classe I et présentent donc des antigènes intracellulaires aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les gènes HLA-DP, -DM, -DQ, -DR, -DOB et -DOA correspondent au CMH de classe II et présentent aux lymphocytes T CD4⁺ les antigènes extracellulaires.

Les gènes HLA de classe I ont été les premiers facteurs génétiques de l'hôte identifiés comme affectant l'évolution du SIDA. Les allèles HLA de classe I influent sur l'efficacité de la réponse immunitaire et ainsi sur la progression de VIH.

Ainsi, il a été démontré que l'homozygotie du HLA de classe I pour un, deux ou trois loci est corrélée positivement avec la progression de la maladie. De même, les individus homozygotes pour les HLA-A,-B et -C ont montré une plus rapide progression vers le stade SIDA (Carrington et al., 1999) et l'allèle HLA-B*35 Px est associé à une progression plus rapide vers le stade SIDA (Gao et al., 2001). Au contraire, les allèles HLA-B*57 et HLA-B*27 ont été associés à une progression retardée de la maladie.

Des études ont montré que l'expression du récepteur activateur KIR3DS1 en absence de son ligand HLA-Bw4-801, de la famille d'allèles HLA-Bw4, accroissait la susceptibilité des individus à la progression vers le stade SIDA. Au contraire, cette expression était fortement protectrice lorsqu'un ou plusieurs de ces allèles HLA-Bw4 était également exprimé (Carrington et al., 2008; Carrington and O'Brien, 2003).

2.3. Ligands naturels des corécepteurs: les chimiokines

Les chimiokines CCL5 (RANTES), CCL3 (Mip1 α) et CCL4 (Mip1 β) sont des ligands du CCR5 et inhibent de façon compétitive l'entrée cellulaire du VIH-1 de tropisme R5. Il a été démontré qu'une diminution du taux de CCL5 est associée à l'acquisition du VIH, la progression vers le stade SIDA et une charge virale élevée dans les populations asiatiques et européennes (An et al., 2002; Duggal et al., 2005; Rathore et al., 2008), les effets néfastes se poursuivant même après un traitement antiviral (Hendrickson et al., 2008). Au contraire, une régulation positive de l'allèle -28G du CCL5 a été associée à une progression favorable de la maladie dans les populations asiatiques (Koizumi et al., 2007; Wichukchinda et al., 2006). Le CCL3 a été également décrit comme efficace dans l'inhibition du VIH (Deeks and Walker, 2007). Plus controversé, une faible quantité de copie de CCRL3L1, un ligand du CCR5 codé par 1 à 7 gènes dupliqués a été décrite comme facteur de risque pour l'acquisition du VIH et du SIDA (Gonzalez et al., 2005). Cependant, trois études plus récentes utilisant des méthodes permettant de quantifier le nombre de copie d'un gène plus pointues, n'ont pourtant pas réussi à reproduire ces résultats (Bhattacharya et al., 2009; Field et al., 2009; Urban et al., 2009).

Le SDF-1 (*Stromal Derived Factor-1*) est un ligand naturel du corécepteur CXCR4 et empêcherait donc la fixation du VIH de tropisme X4 sur les cellules cibles. Les virus prépondérants circulants étant de tropisme X4 dans les étapes avancées de la maladie, il a été suggéré qu'une production soutenue de SDF-1 par un variant du gène SDF-1 permettrait un délai dans l'apparition du stade SIDA chez les individus homozygotes (Piacentini et al., 2009).

2.4. Facteurs de restrictions cellulaires

Le VIH-1 a besoin de nombreux facteurs cellulaires (p300 activant l'intégrase, la cycline T1 et le CDK9 qui sont des co-facteurs de Tat par exemple) pour mener à bien son cycle viral et ainsi disséminer dans l'organisme. Certaines protéines cellulaires, au contraire, agissent comme des facteurs de restriction en bloquant une ou plusieurs étapes du cycle viral.

2.4.1. La téthérine

La téthérine est une protéine ubiquitaire produite par les cellules en réponse à certaines infections virales (taux d'expression de la téthérine contrôlé par la présence d'IFN α). Elle n'empêche pas le bourgeonnement viral mais, sous son action, le virus est retenu à la surface de la cellule.

Cette protéine, capable de s'associer aux membranes, est constituée de deux parties identiques recouverte de sucres sur leur partie externe. L'association des deux parties paraît nécessaire à

l'activité antivirale de la téthérine. En effet, leur dissociation ainsi que l'élimination des sucres se trouvant à sa surface inhibe l'activité de la protéine (Perez-Caballero et al., 2009).

L'action de la téthérine est cependant bloquée par la protéine virale Vpu du VIH-1 du groupe M (Sauter et al., 2009).

2.4.2. La protéine TRIM5 α

Il est connu depuis plusieurs années déjà que la protéine TRIM5 α (*TRIPartite Motif protein 5 α*) est exprimée de manière ubiquitaire chez les mammifères. Chez les singes Rhésus, cette protéine est capable de bloquer totalement le VIH-1 (Stremlau et al., 2004) mais n'a pas d'effet sur son homologue simien le SIV. Ainsi, la protéine TRIM5 α est un facteur de restriction de l'hôte: TRIM5 α empêche l'infection de rétrovirus d'espèces distincts mais a un effet limité sur les rétrovirus infectant naturellement cette espèce (Malim and Bieniasz, 2012).

Bien que cette restriction soit limitée, TRIM5 α humain interfère sur la réplication de certains isolats de VIH-1 en séquestrant et dégradant la capsid virale. Il a également été montré que TRIM5 α peut altérer le transport nucléaire du complexe de préintégration (Wu et al., 2006). Durant l'assemblage viral, la capsid du VIH-1 lie la cyclophiline A (CypA), une protéine cellulaire servant au repliement des protéines, qui est alors hautement incorporée dans les virions. Cette liaison augmente l'infection virale suggérant que la CypA inhibe un facteur de restriction cellulaire. Il a été initialement proposé que ce facteur de restriction cellulaire était TRIM5 α et que la CypA agissait en masquant son site de liaison (Towers et al., 2003). Cependant, il a été démontré que l'augmentation de l'infection par la CypA est indépendante de TRIM5 α et qu'elle protégerait le VIH-1 d'un autre facteur cellulaire antiviral (Sokolskaja et al., 2006; Stremlau et al., 2006).

Plus récemment, des études ont montré que TRIM5 α agit également indirectement sur le virus par le biais de réactions cellulaires en chaîne en activant les gènes dépendants des facteurs cellulaires MAPK, AP1 et NF κ B qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée. Cette activation a lieu en l'absence de virus mais augmente suite à la reconnaissance de la capsid virale. TRIM5 α active les facteurs de transcription NF κ B et AP1 en se fixant au complexe TAK1 permettant ainsi de désactiver les protéines I κ B et MKK, connues pour inhiber NF κ B et AP1 (Pertel et al., 2011). Ainsi TRIM5 α améliore la signalisation du système immunitaire en plus d'être un facteur de restriction spécifique des capsides rétrovirales.

2.4.3. La famille de protéines APOBEC3

La famille des protéines APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA-editing complex 3*) comprend sept protéines (A, B, C, D/E, F, G et H) qui sont des enzymes encapsidées dans les virions lors du bourgeonnement ainsi que des médiateurs clés de la restriction des rétrovirus en induisant des hypermutations dans le génome du virus. Cependant la protéine auxiliaire Vif du VIH contrecarre leur action antivirale en provoquant leur dégradation par le protéasome (tableau 1).

Il a été suggéré l'existence d'une corrélation positive entre le taux d'expression d'**APOBEC3G** et une évolution favorable de la maladie (An and Winkler, 2010). Une forte expression de la protéine dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) et dans les tissus

cervicaux a été observée chez les femmes séronégatives exposées au VIH. *In vitro*, les expériences ont également montré que les PBMCs de ces femmes étaient résistants à l'infection par la souche R5 du VIH (Biasin et al., 2007).

La protéine **APOBEC3B** est en partie résistante à la dégradation médiée par Vif et présente une activité anti-VIH non négligeable. Une étude a montré qu'une absence de la protéine (homozygotie *apobec3b*^{-/-}) serait associée à un risque accru d'infection par le VIH, une charge virale plus élevée ainsi qu'une progression plus rapide vers le stade SIDA (An et al., 2009).

Récemment, il a été démontré que la protéine **APOBEC3A**, dont l'expression est spécifique des cellules myéloïdes, inhibe non seulement le VIH-1 mais également d'autres lentivirus humain. La déplétion du "pool" de protéine APOBEC3A conduit à une accumulation de l'ADN viral suggérant donc que cette protéine induit la dégradation des génomes viraux. La protéine virale Vpx offre une protection partielle contre ce facteur en induisant sa dégradation *via* le protéasome (Berger et al., 2011).

Protéine	Activité anti-VIH-1	Expression dans les cellules T CD4 ⁺	Résistance à Vif
APOBEC3A	Forte	Faible	Partielle
APOBEC3B	Forte	Faible	Complète
APOBEC3C	Faible	Non	Non
APOBEC3D/E	Faible	Non	Non
APOBEC3F	Forte	Forte	Partielle
APOBEC3G	Forte	Forte	Non
APOBEC3H	Forte/faible selon le variant	Forte	Oui/Non selon le variant

Tableau 1. Profil anti-VIH des protéines APOBEC3 proposé (adapté de (An and Winkler, 2010)).

2.4.4. La protéine SAMHD1

Cette protéine a récemment été démontrée comme ayant des activités anti-VIH dans les cellules myéloïdes (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011). Le domaine HD (histidine-aspartic) de la protéine SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) est une enzyme dNTPase, régulée par le dGTP, diminuant le "pool" de désoxynucléotides triphosphates (Goldstone et al., 2011; Kim et al., 2012; Lahouassa et al., 2012) et étant suffisante pour restreindre l'infection par différents virus (White et al., 2013). Ce domaine HD est également nécessaire à l'oligomérisation de SAMHD1 et sa liaison à l'ARN (White et al., 2013) au contraire du domaine SAM (*sterile alpha motif*).

En utilisant la lignée cellulaire THP-1, infectées par le VIH-2 mais peu par le VIH-1, les recherches ont permis de montrer que Vpx, exprimée par le VIH-2, provoque la dégradation de SAMHD1 (Laguette et al., 2011). Ils ont démontré que les cellules qui résistent à VIH-1 possèdent une importante quantité de SAMHD1 alors que cette protéine n'est quasiment pas exprimée dans les cellules sensibles au virus. De plus, en bloquant SAMHD1 dans les lignées cellulaires et les cellules primaires, une forte augmentation de l'infection par VIH-1 a été observée. Ces résultats suggèrent donc que SAMHD1 est un facteur de restriction important du VIH-1 dans les cellules myéloïdes.

Plus récemment, le mécanisme antiviral de la protéine SAMHD1 a été identifié (Goldstone et al., 2011): SAMHD1 dégrade la majorité des dNTPs cellulaires, qui sont nécessaires à la transcription inverse du génome viral et à la synthèse de l'ADN complémentaire, et donc inhibe la réplication du virus.

Très récemment, il a été démontré que la protéine SAMHD1 inhibe également très significativement le transfert du virus des lymphocytes T aux cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs) en contrôlant la sensibilité des MoDCs à l'infection par le VIH-1. De plus, la protéine SAMHD1 empêche la réponse interféron de type I influant alors sur le déclenchement de la réponse innée (Puigdomènech et al., 2013).

Il a également été décrit que les Alpha- (virus de l'érythroblastose aviaire), Beta- (virus de la tumeur mammaire de la souris) et Gamma- (virus de la leucose féline) rétrovirus sont restreints par la protéine SAMHD1 dans les cellules myéloïdes au contraire des rétrovirus foamy et HTLV-1 qui ne semblent pas affectés par la protéine SAMHD1 (Gramberg et al., 2013).

3. VIH-1 et système immunitaire

3.1. Réponses immunitaires de l'hôte

Le système immunitaire se compose d'une part de la réponse innée (non spécifique) et d'autre part de la réponse adaptative (spécifique). L'immunité innée est constitutivement présente et est mobilisée immédiatement après l'infection. Ceci est en contraste avec le système immunitaire adaptatif qui est mis en place plus tardivement, répond précisément à chaque infection et génère une mémoire immunologique.

3.1.1. Immunité innée

Les éléments de l'immunité innée comprennent les barrières anatomiques (mécaniques: surfaces épithéliales, et chimiques: lysozyme et phospholipase de la salive, des larmes et des sécrétions nasales par exemple), les molécules sécrétoires (tel que l'interféron, le lysozyme et l'interleukine) et des composants cellulaires (macrophages, cellules NK, neutrophiles et éosinophiles). Elle est conçue pour reconnaître des structures fortement conservées présentes dans de nombreux micro-organismes appelées *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) dont le LPS (lipopolysaccharide) de la paroi cellulaire des bactéries gram négatif, le peptidoglycane, les acides lipotéchoïques de la paroi cellulaire des bactéries gram positif, le mannose, l'ADN bactérien, les ARN double brin viraux, et les glycanes de la paroi des cellules fongiques. La plupart des cellules immunitaires possèdent des *pattern-recognition receptor* (PRR) reconnaissant ces PAMP et induisant une réponse immune immédiate contre les micro-organismes.

La principale composante de la réponse innée est l'inflammation. Les cellules lésées libèrent des cytokines et d'autres facteurs pro-inflammatoires contenant ainsi la propagation de l'infection et favorisant la guérison. Ces médiateurs pro-inflammatoires induisent la vasodilatation et attirent les phagocytes. L'activation de la cascade du complément améliore la

réponse innée. Une conséquence importante de cette activation est l'opsonisation des antigènes induisant l'ingestion et la destruction par les phagocytes. La réponse innée implique un grand nombre de types de cellules, mais est particulièrement dépendante des basophiles et des mastocytes (inflammation) ainsi que des neutrophiles et des macrophages (phagocytose). Une autre fonction importante du système immunitaire inné est de stimuler la réponse immunitaire adaptative *via* la présentation antigénique.

3.1.2. Immunité adaptative

La réponse adaptative est divisée en deux parties: l'immunité humorale, qui prend en charge les agents infectieux dans les tissus sanguins et le corps, et l'immunité à médiation cellulaire, qui cible les cellules du corps déjà infectées. En général, le système humoral est géré par les cellules B (avec l'aide de cellules T), et le système à médiation cellulaire est entretenu par les cellules T.

3.1.2.1. Immunité cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire dépend de l'activité des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et est basée sur la présentation antigénique des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) aux lymphocytes T.

- **Antigènes extracellulaires :**

Les APC phagocytent les pathogènes exogènes, puis migrent dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes soit par le CMH II aux cellules T $CD4^+$ qui s'activent alors soit, par présentation croisée, par le CMH I aux lymphocytes T $CD8^+$.

- **Antigènes intracellulaires :**

Lorsque les APC ou toutes autres cellules exprimant le CMHI sont infectées, les antigènes endogènes sont présentés par le CMH I aux lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques qui s'activent alors, et tuent directement la cellule infectée en relarguant des enzymes (granzymes) entrant dans la cellule cible et activant l'apoptose de celle-ci.

3.1.2.2. Immunité humorale

L'immunité humorale (ou immunité médiée par les anticorps) implique les lymphocytes B qui reconnaissent les antigènes ou pathogènes circulants. La réponse humorale débute par la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes B naïfs. Ils sont alors soumis à un processus d'expansion clonale et à une différenciation en cellules B matures sécrétant des anticorps ou en cellules mémoires. Ainsi, si l'individu est à nouveau exposé au même antigène, ces cellules mémoires reconnaîtront l'antigène et répondront plus rapidement et plus efficacement.

Les anticorps sont les effecteurs de la réponse humorale. Ils sont capables de neutraliser les antigènes, en permettant leur dégradation par les macrophages, l'activation du complément et la promotion de réponses innées fortes.

3.2. Anticorps et VIH-1

A l'heure actuelle, aucun traitement ne permet de guérir l'infection par le VIH et la recherche se concentre vers l'induction d'un vaccin dit "prophylactique" contre le virus (voir chapitre 2, paragraphe 4.1). Il est actuellement admis que l'induction d'anticorps dit "neutralisants" par le vaccin est le meilleur corrélat de protection.

3.2.1. Mécanismes de protection médiés par les anticorps

Les anticorps peuvent protéger contre les infections virales par plusieurs mécanismes, le principal étant médié par les anticorps neutralisants (figure 14).

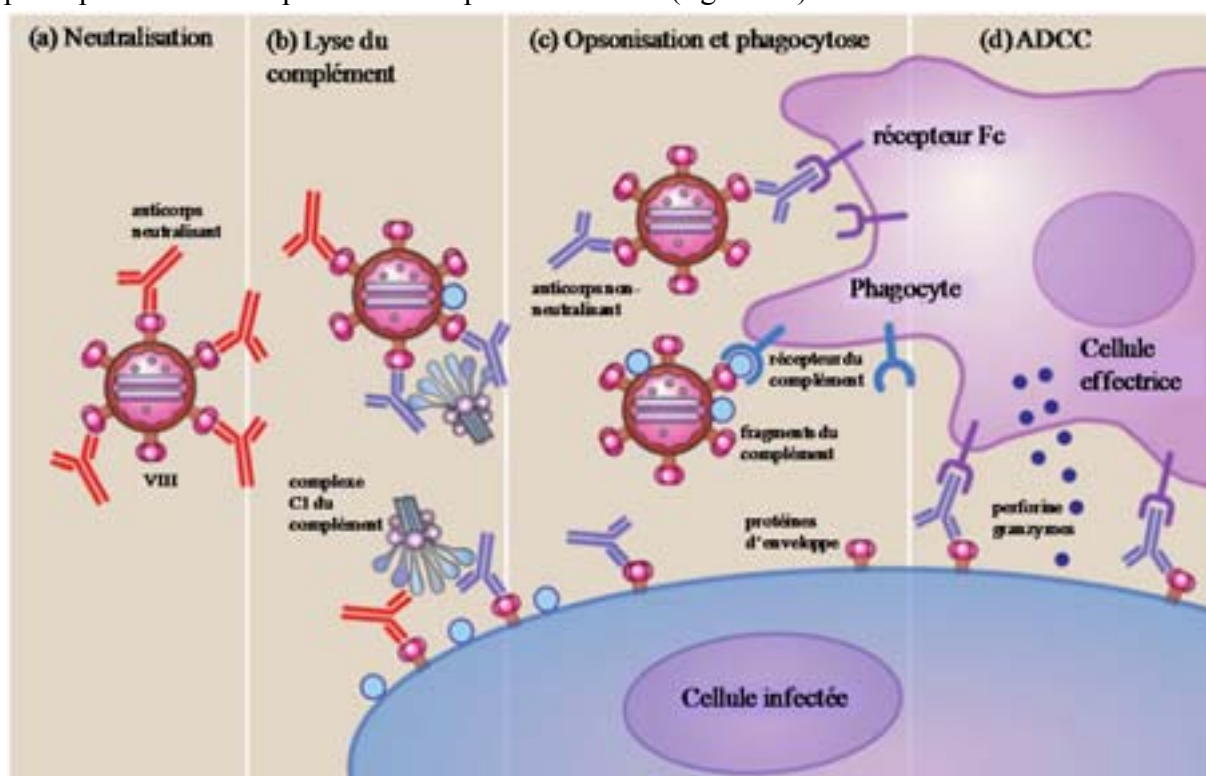


Figure 14. Mécanismes d'action des anticorps neutralisants (rouge) et non-neutralisants (bleu) contre le VIH-1 (modifié d'après (Huber and Trkola, 2007)).

3.2.1.1. Neutralisation

La neutralisation est définie comme "la perte d'infectivité survenant lorsque des anticorps se lient à une particule virale, et se produit généralement sans la participation de tout autre agent" tels que le complément ou les récepteurs Fc (Dimmock, 1995).

Bien que le mécanisme précis de la neutralisation ne soit encore que partiellement compris, il est admis que la liaison de l'anticorps au virus peut bloquer sa fixation à la surface des cellules cibles. De même, l'anticorps peut interférer dans une chaîne d'événements (tels que les changements conformationnels) nécessaire à l'entrée virale. Ou encore, l'encombrement stérique provoqué par l'anticorps au niveau de l'interface de fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe du virus peut également bloquer la fusion à la surface de la cellule (Klasse and Sattentau, 2002) (figure 14a). Plus précisément, les anticorps peuvent cibler les

virus libres ainsi que les cellules productrices de virus en se liant à des molécules à la surface des virus ou des cellules infectées et ainsi, empêcher de nouvelles infections et contrôler la réplication virale.

L'entrée virale, médiée par les glycoprotéines d'enveloppe du VIH, est une étape essentielle dans la réplication du VIH. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont donc les principales cibles des anticorps neutralisants. Ils lient spécifiquement diverses régions de la gp120 et de la gp41 incluant le site de liaison au CD4 (CD4bs), le site du CD4 induit (CD4i), et les boucles V2 et V3 de la gp120, ainsi que le peptide de fusion et la région MPER (*Membrane-Proximal External Region*) de la gp41.

3.2.1.2. Le système du complément

Le système du complément est un composant clé de l'immunité innée et un effecteur crucial de l'immunité adaptative. Il comporte une série de protéines solubles produites par le foie, circulant sous une forme inactive et s'activant en réponse à la reconnaissance d'un pathogène (voie alterne et voie des lectines) ou suite à la reconnaissance d'un anticorps fixé à la surface d'un pathogène ou d'une cellule infectée. L'activation de la cascade du complément conduit à la chimiotaxie, l'inflammation et augmentation de la perméabilité capillaire, l'opsonisation (figure 14b et c) et la cytolyse (Blue et al., 2004). Il existe 3 voies du complément:

- la voie classique du complément, activée par les complexes antigène-anticorps (immunité adaptative)
- la voie des lectines, activée par l'interaction entre les carbohydrates microbiens et les protéines liant le mannose (immunité innée).
- la voie alterne, activée par la fixation de C3b aux surfaces microbiennes et aux anticorps (immunité innée).

Des études ont démontré que l'infection par le VIH active directement la voie classique du complément en l'absence d'anticorps spécifiques du virus. De plus, l'activation de la voie des lectines est déclenchée par la liaison de lectines, liant le mannose, à la gp120 du VIH. Cependant, plusieurs études ont démontré un rôle néfaste du complément qui pourrait favoriser l'infection des DCs, macrophages et lymphocytes T attirés par chimiotactisme (Blue et al., 2004; Huber and Trkola, 2007; Stoiber et al., 2008).

3.2.1.3. Récepteurs Fc γ et immunité spécifique du VIH-1

Les récepteurs Fc γ (RFc γ) sont des glycoprotéines présentes à la surface de diverses cellules immunitaires agissant sur la réponse immunitaire grâce à leur capacité à lier le segment Fc des immunoglobulines G (IgG). Parmi les trois classes de RFc γ de l'Homme (RFc γ I ou CD64, RFc γ II ou CD32 et RFc γ III ou CD16), le RFc γ II est le plus largement réparti entre les cellules hématopoïétiques et est le seul à être présent sur les plaquettes et mégacaryocytes. Il existe trois gènes codant pour les RFc γ II (RFc γ IIa, RFc γ IIb et RFc γ IIc) et deux pour les RFc γ III (RFc γ IIIa, RFc γ IIIb).

Les RFc γ transmettent des signaux d'activation ou d'inhibition intracellulaire. La nature de ces signaux dépend principalement de motifs moléculaires exprimés au niveau des domaines intra-cytoplasmiques du RFc γ ou des sous-unités du récepteur avec lequel est associé le RFc γ .

Le RFc γ IIb est le seul à transmettre un signal inhibiteur *via* un ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*). Les autres RFc γ , à l'exception du RFc γ IIIb ancré par un résidu glycosyl-phosphatidylinositol (impliqué dans la neutropénie auto-immune), transmettent des signaux activateurs *via* un ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) (Jönsson and Daëron, 2012).

Les différentes classes de récepteurs Fc γ et leur affinité pour le segment Fc des IgG sont résumés figure 15.

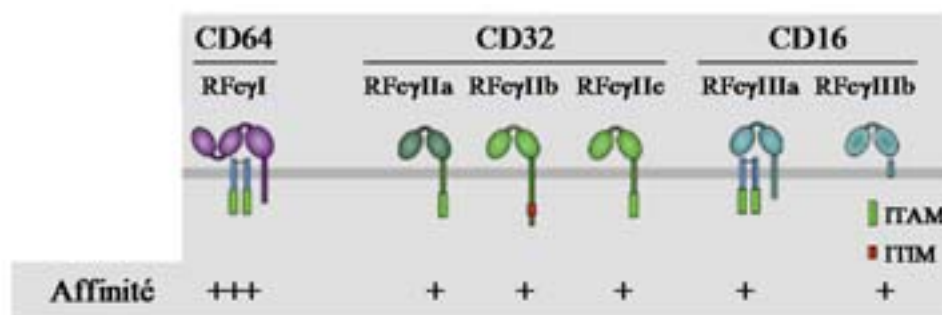


Figure 15. Récepteurs pour le segment Fc des immunoglobulines G identifiés chez l'Homme (modifié d'après (Jönsson and Daëron, 2012)).

3.2.1.3.1. Inhibition du VIH-1 par les RFc

La participation de la partie Fc des immunoglobulines dans l'inhibition de l'infection des cellules cibles a été mise en évidence *in vitro* dans les macrophages dérivés de monocytes (Holl et al., 2004), les MoDCs (Holl et al., 2006b) ainsi que les cellules de Langerhans (Peressin et al., 2011) suggérant ainsi l'implication d'une fonction inhibitrice de l'anticorps distincte de la neutralisation médiée par le domaine Fab (figure 14c). Ainsi, des anticorps monoclonaux, nommés anticorps non-neutralisants inhibiteurs (AcNNI) (Holl et al., 2006b), ne possédant pas d'activité neutralisante mais capables de fixer et de reconnaître d'une part des épitopes accessibles sur la particule virale, et d'autre part sont capables d'inhiber (à des concentrations très faibles en IgG) l'infection par le VIH-1 sur les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans, cellules cibles du virus au niveau des muqueuses (Holl et al., 2006a; Peressin et al., 2011). Ces résultats ont ainsi ouvert de nouvelles perspectives pour le développement d'anticorps capables d'inhiber la multiplication du VIH (Holl et al., 2004; Holl et al., 2006a; Holl et al., 2006b).

Ce mécanisme d'inhibition du VIH-1 dépendant des RFc γ , impliquerait la dégradation du virus opsonisé par les cellules présentatrices d'antigènes suite à un processus d'endocytose.

3.2.1.3.2. ADCC

La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) fait également intervenir la partie Fc des anticorps (neutralisants et non-neutralisants). Les cellules effectrices, généralement les cellules NK, se lient à la partie Fc de l'anticorps tandis que la partie Fab reconnaît la cellule infectée. Cette reconnaissance entraîne la libération de protéines porogènes (perforines), d'enzymes protéolytiques (granzymes), de granules de chimiokines et de protéases par la cellule effectrice (figure 14d). Les granzymes passent à travers les pores de la cellule cible et activent

les caspases conduisant à l'apoptose de la cellule infectée. Lorsqu'un très grand nombre de perforines entre dans la cellule infectée, cela conduit à la lyse cellulaire plutôt qu'à l'apoptose. Plusieurs études ont montré que l'ADCC est associée à une protection contre la maladie SIV chez les macaques (Banks et al., 2002; Gómez-Román et al., 2005), un retard de la progression de l'infection chez l'Homme (Ahmad et al., 2001; Lambotte et al., 2009) et une charge virale au niveau génital plus faible (Nag et al., 2004).

3.2.1.3.3. ADCVI

Tout comme l'ADCC, l'ADCVI (*Antibody-Dependent Cell-mediated Virus Inhibition*) résulte de l'interaction de cellules cibles, d'anticorps et de cellules exprimant les RFc γ . Néanmoins, l'ADCC se concentre sur la mortalité des cellules cibles, alors que l'ADCVI mesure l'effet global, *in vitro*, des anticorps sur la réplication virale en présence de cellules effectrices. Bien qu'une partie de l'ADCVI soit le reflet de l'ADCC, des effets non cytolytiques tels que l'inhibition dépendante des RFc γ ou la production de β -chimiokines peuvent jouer un rôle dans l'inhibition du virus (Forthal and Moog, 2009).

3.2.2. Réponse anticorps contre le VIH-1

La réponse humorale initiale à l'infection par le VIH-1 se développe environ une semaine après l'infection sous la forme de complexes antigène-anticorps (Tomaras et al., 2008). Cette phase est suivie par la production d'anticorps anti-gp41 (quelques jours plus tard) puis d'anticorps anti-gp120 (quelques semaines plus tard) ciblant principalement la boucle V3. Ces anticorps n'ont cependant aucun effet détectable sur la virémie (Tomaras et al., 2008) et ne semblent pas exercer de pression de sélection sur l'enveloppe (Keele et al., 2008). Les anticorps capables de neutraliser le virus autologue (virus fondateur) ne surviennent qu'environ 12 semaines plus tard. Ces anticorps ne sont néanmoins pas capables de neutraliser les virus les plus divergents circulant au moment du prélèvement (virus hétérologues) (Moog et al., 1997). Malgré la capacité du virus à échapper à la réponse immunitaire, il a été démontré par l'analyse des sérums de patients infectés par le VIH-1 que 10 à 25 % de ces individus possèdent des anticorps neutralisants réagissant contre diverses souches de VIH-1 (Sather et al., 2009; Simek et al., 2009; Stamatatos et al., 2009b). Des anticorps neutralisants hétérologues capable de neutraliser la large majorité des isolats circulants de VIH-1 surviennent 20 à 30 mois après l'infection (Gray et al., 2011; Mikell et al., 2011; Stamatatos et al., 2009b).

3.2.3. Anticorps neutralisants monoclonaux spécifiques du VIH-1

3.2.3.1. Anticorps neutralisants et élites contrôleurs

Des équipes ont étudié les anticorps neutralisants chez les patients élite contrôleurs dans l'espoir de déterminer si ces anticorps contribuaient à un contrôle viral. De manière surprenante, les premières données ont montré que les élites contrôleurs ont des taux d'anticorps neutralisants hétérologues plus faibles que les individus ayant une charge virale élevée (Deeks et al., 2006; Pereyra et al., 2009). L'étude multicentrique ANRS EP36 a comparé les taux d'anticorps neutralisants hétérologues chez les élites contrôleurs et les

individus virémiques. Cette étude a confirmé que les individus contrôlant leur charge virale avaient des taux d'anticorps neutralisants plus faibles que les individus virémiques (Lambotte et al., 2009). De plus, des études sur les quasi-espèces de différents variants viraux ont montré que les variants résistants à la neutralisation étaient prédominants chez les élites contrôleurs (Mahalanabis et al., 2009). Toutes ces études suggèreraient que les anticorps neutralisants ne seraient pas responsables du contrôle de la charge virale chez les élites contrôleurs.

3.2.3.1. Anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH-1

La notion d'anticorps neutralisants à large spectre se réfère spécifiquement à des anticorps monoclonaux, clonés à partir d'individus infectés, ayant la capacité de prévenir l'infection des cellules cibles par le VIH. Ils sont capables de neutraliser la plupart des isolats du VIH, et sont d'un intérêt particulier pour le développement de vaccins, car ils peuvent également neutraliser les virus de différents sous-types.

Plusieurs anticorps monoclonaux humains ayant des capacités neutralisantes à large spectre contre des souches de VIH-1 adaptées en laboratoire et divers isolats primaires *in vitro* ont été isolés chez des individus infectés par du VIH-1 et ciblent plusieurs épitopes sur les glycoprotéines d'enveloppe, gp120 et gp41, du VIH-1 (figures 16 et 17).

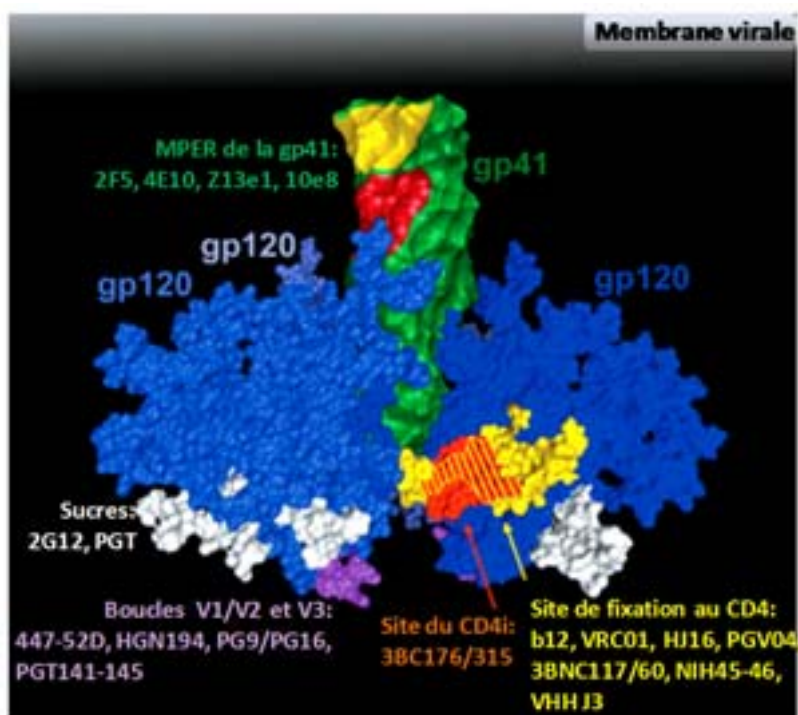


Figure 16. Épitopes reconnus par les anticorps neutralisants monoclonaux à large spectre dirigés contre la gp120 et la gp41 du VIH-1 (modifié d'après (Burton et al., 2004)).

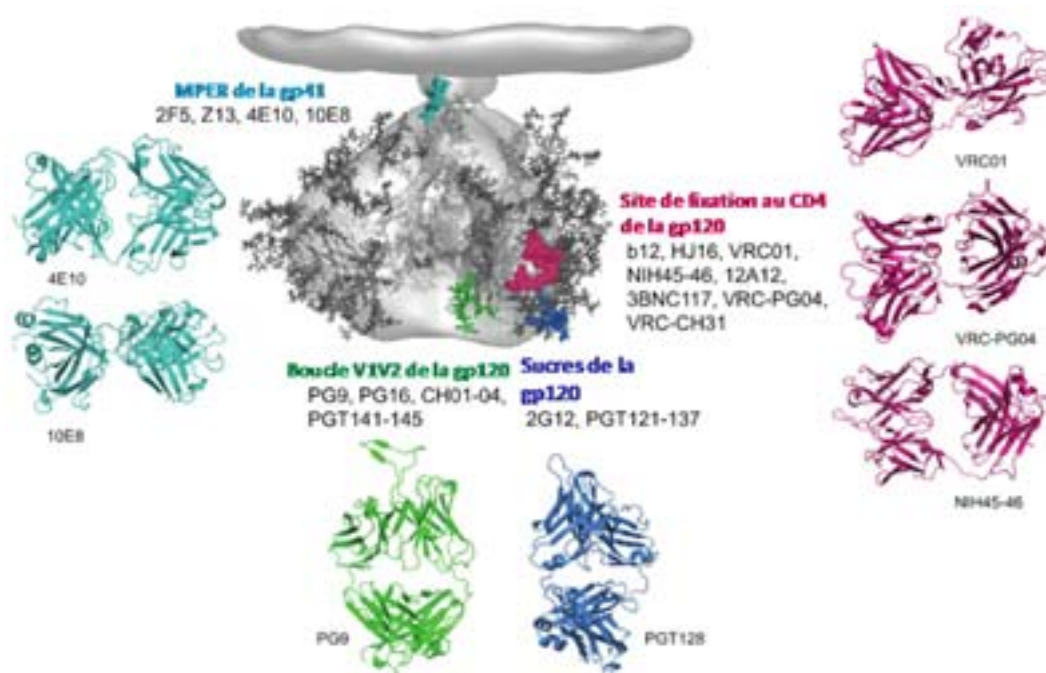


Figure 17. Représentation du trimère de gp120 à partir de la structure obtenue par cryo-électromicroscopie. Les sucres ainsi que les épitopes reconnus par les différents anticorps neutralisants sont représentés (modifié d'après (Kwong and Mascola, 2012)).

3.2.3.1.1. Glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41

La **gp120** représente la partie externe de la glycoprotéine d'enveloppe et est impliquée dans les étapes précoces de l'infection virale des cellules cibles. Elle se compose de domaines protéiques conservés et variable. Les régions variables V1/V2 et V3 sont des structures en boucle constituant une part importante des caractéristiques de surface de la gp120. La boucle hypervariable V1/V2 est subdivisée en domaines V1 et V2 par un pont disulfure et est impliquée dans la modulation du tropisme viral et la résistance à la neutralisation (Benjelloun et al., 2012). La boucle V3 contient le site de fixation aux co-récepteurs viraux CCR5 et CXCR4 (Benjelloun et al., 2012). La fixation de la gp120 au récepteur CD4 et aux co-récepteurs entraîne des changements conformationnels et déclenche la mise en place d'un «complexe de fusion».

La **gp41** est le domaine transmembranaire de la glycoprotéine d'enveloppe ancrant les spicules du VIH dans la membrane virale et joue un rôle important dans la fusion membranaire et l'entrée du virus dans la cellule. Les séquences de la gp41 sont plus conservées que ceux de la gp120 et ne contiennent que quatre sites de N-glycosylation hautement conservés contribuant à l'efficacité optimale de la réplication virale (Benjelloun et al., 2012).

3.2.3.1.2. Anticorps dirigés contre le site de fixation au CD4

L'**anticorps IgG1 b12** est le premier anticorps neutralisant à avoir été identifié en 1992. Il a été isolé à partir d'une banque de phages construite à partir de la moelle osseuse d'un homme de 31 ans séropositif mais asymptomatique depuis six ans (Barbas et al., 1992; Burton et al., 1991; Burton et al., 1994). L'IgG1 b12 reconnaît, *via* sa chaîne lourde, un épitope

conformationnel proche du site de liaison au CD4. Sa capacité à neutraliser le VIH *in vivo* a été testée sur des macaques par immunisation passive. Les singes ont été protégés mais les doses nécessaires à leur protection étaient trop élevées (25 mg/kg pour une protection totale) pour être envisageables pour l'homme (Parren et al., 2001).

L'**anticorps VRC01** a été isolé à l'aide d'une protéine artificielle dérivée de l'enveloppe virale dont la région se fixant normalement au CD4 interagit spécifiquement avec les anticorps, RSC3 (Wu et al., 2010). Les similarités et les différences entre les sites viraux reconnus par le CD4 et l'anticorps VRC01 ont été comparés. Il a alors été constaté que la liaison entre le VRC01 et le virus est très proche de celle du CD4 avec le virus, malgré des différences considérable de structure. De plus, l'anticorps VRC01 possède une affinité pour la protéine d'enveloppe virale plus forte que celle de CD4 et des autres anticorps, ce qui lui confère un puissant pouvoir de neutralisation du VIH.

Les **anticorps NIH45-46**, **3BNC117** et **3BNC60** ont été isolés des lymphocytes B provenant du même patient que pour l'anticorps VRC01, et utilisant le processus permettant la sélection d'anticorps reconnaissant une glycoprotéine gp120 du VIH stabilisée pour faciliter la reconnaissance du site de fixation du CD4, ou du CD4 induit (Scheid et al., 2011). Ces anticorps, tout comme l'anticorps VRC01, neutralisent 85 à 95% des isolats de patients (Corti and Lanzavecchia, 2013).

Par leur liaison au niveau du site de fixation du virus au CD4, ces anticorps neutralisants entrent ainsi en compétition avec le principal récepteur du VIH-1, le CD4.

3.2.3.1.3. Anticorps dirigés contre des sucres de la gp120

L'**anticorps 2G12** neutralise efficacement les différents sous-types de VIH-1 et plus spécialement le sous-type B. Il se lie à des N-glycanes à proximité de la boucle V3 de la gp120 (Calarese et al., 2003; Pantophlet and Burton, 2006; Scanlan et al., 2002).

Contrairement à la "forme" usuelle des anticorps en Y, le 2G12 est un anticorps plutôt inhabituel de part l'organisation de sa chaîne lourde "tirant" les bras de l'anticorps l'un vers l'autre, les plaçant de manière adjacente. Cela lui permet de lier plusieurs N-glycanes avec une faible pénalité entropique (Calarese et al., 2003; Scanlan et al., 2002) et ainsi d'avoir une activité neutralisante sur de nombreux sous-types.

17 **anticorps PGT**, dont 12 dirigés contre des sucres de la gp120, ont été mis en évidence suite à un criblage fonctionnel des IgG de patients élités contrôleurs. Les 12 PGT dirigés contre le bouclier glycanique entrent en compétition avec l'anticorps monoclonal 2G12 et, à l'exception des anticorps PGT135-137, sont également en compétition avec un anticorps monoclonal spécifique de la boucle V3 de la gp120, le F425/b4e8, suggérant ainsi qu'ils reconnaissent un épitope proche de la boucle V3 (Walker et al., 2011).

3.2.3.1.4. Anticorps dirigés contre les boucles V1/V2 et V3

L'**anticorps 447-52D**, isolé d'un individu infecté par le VIH-1, est en mesure de neutraliser environ 50% des isolats primaires de sous-type B (Gorny et al., 1992). Cet anticorps cible

l'épitope, très conservé bien que difficilement accessible, KSIHIGPGRAF, de la boucle V3 de la gp120 des virus de sous-type B (Binley et al., 2004).

A partir d'un donneur africain infecté par un virus de sous-type A, Burton et ses collègues ont isolé les **anticorps PG9 et PG16** qui se fixent à un épitope quaternaire de la gp120 et neutralisent 70 à 80% des isolats testés (Walker et al., 2009). Plus précisément, ces deux anticorps se lient à un épitope protéoglycane grâce à la région CDR3 de leur chaîne lourde (CDRH3), caractérisée par une conformation en forme de marteau qui pénètre les glycanes N156 et N160 afin d'atteindre la région V1/V2 de la gp120 (Doria-Rose et al., 2012; McLellan et al., 2011).

Les **anticorps PGT141-145** reconnaissent des épitope glycaniques de la boucle V1/V2 de la gp120. Ils entrent en compétition avec l'anticorps PG9, suggérant la reconnaissance d'un épitope analogue (Walker et al., 2011).

3.2.3.1.5. Anticorps dirigés contre le site du CD4 induit

Pour isoler l'**anticorps 3BC176**, Klein et ses collègues ont utilisé une stratégie basée sur la capture de lymphocytes B reconnaissant la protéine Env du VIH exprimée à la surface des cellules transfectées (Klein et al., 2012). Cet anticorps dirigé contre la gp120 du virus neutralise 60 à 70% des isolats de virus testés en ciblant un nouvel épitope situé à proximité de la boucle V3 et du site du CD4 induit (Corti and Lanzavecchia, 2013).

3.2.3.1.6. Anticorps dirigés contre la région MPER de la gp41

Quatre anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre, dirigés contre la région MPER de la gp41, ont été identifiés: l'anticorps **4E10**, l'anticorps **2F5**, l'anticorps **Z13e1** et l'anticorps **10e8** (Binley et al., 2004; Dennison et al., 2009; Huang et al., 2012; Mehandru et al., 2004; Zwick et al., 2001). La région MPER est l'une des séquences hautement conservées de l'enveloppe et joue un rôle crucial dans la fusion des membranes virales et cellulaires (Salzwedel et al., 1999). De ce fait, les anticorps 2F5, 4E10, Z13e1 et 10e8 inhibent non pas la liaison du virus à la cellule cible mais le phénomène plus tardif de fusion des membranes. Les anticorps 2F5 et 4E10 reconnaissent respectivement les acides aminés 662 à 667 (motif ELDKWA) (Muster et al., 1993; Ofek et al., 2004) et 671 à 676 (motif NWF(D/N)IT) (Stiegler et al., 2001; Zwick et al., 2001) de la région MPER. L'anticorps 2F5 a une activité inhibitrice plus forte que celle de l'anticorps 4E10, qui, lui, est efficace contre une plus grande diversité d'isolats de virus (Binley et al., 2004). Ces deux anticorps possèdent une région CDR3 hydrophobe relativement longue et généralement typique des auto-anticorps polyréactifs et ont la capacité de reconnaître et de réagir contre des composants lipidiques, telle que la cardiolipine, ce qui gênerait le développement d'une réponse humorale dirigée contre le MPER (Haynes et al., 2005), rendant de ce fait leur induction par vaccination délicate.

Récemment, l'anticorps 10e8 également dirigé contre la MPER a été identifié (Huang et al., 2012). Cet anticorps est capable de neutraliser un très grand nombre d'isolats de VIH-1 différents (98% des isolats testés, comme le 4E10 (Corti and Lanzavecchia, 2013)).

Contrairement au 2F5 et au 4E10, cet anticorps n'est pas polyréactif et ne se lit pas aux lipides. Une vaccination avec des immunogènes reconnaissant cet épitope serait donc envisageable.

3.2.4. Stratégies virales pour contrer les anticorps neutralisants

Malgré la forte activité des anticorps neutralisants et inhibiteurs, leur développement est rare et souvent tardif chez les patients infectés. Au cours de l'infection, le virus mute afin d'échapper à la reconnaissance des anticorps et de nombreux variants d'échappement apparaissent. Richman et ses collègues ont montré que les fortes réponses des anticorps neutralisants sont dirigés contre le virus autologue au cours de la phase aiguë de l'infection, ainsi que contre des variants apparaissant durant de la maladie (Richman et al., 2003). Ces résultats suggèrent que les anticorps neutralisants exercent une pression sélective sur le virus permettant la sélection de variants résistants.

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels le VIH-1 génère des variants afin de se soustraire aux réponses immunitaires de l'hôte. Ces mécanismes comprennent des substitutions, insertions et délétions nucléotidiques, des modifications des sites potentiels de N-glycosylation de l'enveloppe (PNGS) empêchant l'accès des anticorps à aux épitopes qu'ils reconnaissent, et des recombinaisons (Bunnik et al., 2008; Mc Cann et al., 2005; Overbaugh and Morris, 2012). L'enveloppe du VIH est fortement glycosylée, avec près de 50% composé de groupements glucidiques peu ou non immunogènes. Wei et al. suggèrent que des mutations dans les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 contribuent à l'acquisition et au réarrangement de groupements sucrés, ce qui, potentiellement, masque des motifs peptidiques et empêche, physiquement, la liaison de l'anticorps (sans réduction de la capacité répliquative du virus) (Lole et al., 1999). La suppression de sites glycanes spécifiques sur la glycoprotéine du VIH-1 peut également augmenter considérablement la sensibilité virale aux anticorps neutralisants (Kolchinsky et al., 2001; McCaffrey et al., 2004; Quiñones-Kochs et al., 2002).

Les mutations dans les boucles variables de la gp120 modifient les séquences d'acides aminés, le motif de glycosylation et la longueur des boucles et pourraient être impliqués dans l'évasion à la neutralisation. Les déterminants virologiques qui influent sur la transmission du VIH ont été évalués lors de transmissions hétérosexuelles et les résultats ont démontré que les virus du receveur avaient une modification dans l'enveloppe du VIH qui possédaient une région V1-V4 plus courte avec moins de PNGS en comparaison avec les quasi-espèces virales présentes chez le donneur (Derdeyn et al., 2004). En outre, les virus transmis sont uniquement sensibles à la neutralisation par les anticorps du partenaire émetteur.

3.2.5. Modèles primates: challenge et immunisation passive

L'efficacité des anticorps neutralisants humains a été confirmée dans des études d'immunisation passive (anticorps injectés dans l'animal) chez les primates non humains lors d'infections expérimentales (challenge) avec un virus chimérique SIV/HIV, appelé SHIV, codant pour l'enveloppe du VIH-1 et se répliquant dans le modèle animal. L'administration d'anticorps neutralisants pré- (Baba et al., 2000; Hofmann-Lehmann et al., 2001; Mascola et al., 1999; Mascola et al., 2000; Parren et al., 2001) ou post-exposition (Ferrantelli et al., 2003;

Hofmann-Lehmann et al., 2002) au virus permet une protection efficace des macaques contre l'infection à SHIV ou la maladie.

L'immunisation passive de femelles gestantes avec une combinaison d'anticorps neutralisants IgG₁ F105 (ciblant le site de liaison au CD4 et ayant un faible pouvoir neutralisant), 2G12 et 2F5 protège complètement les macaques nouveau-nés lors d'un challenge par voie orale avec du virus SHIV-vpu⁺ (Baba et al., 2000; Hofmann-Lehmann et al., 2002). L'analyse pharmacocinétique a montré que le sang de cordon des femelles contenait les trois anticorps neutralisants indiquant le transport efficace de ces anticorps à travers le placenta.

Il a été démontré lors d'un challenge mimant la transmission péri- et postpartum que la combinaison de quatre anticorps neutralisants (b12, 2G12, 2F5 et 4E10) protège 50% des macaques nouveau-nés et prévient le pic de virémie ainsi que la maladie chez les macaques non protégés (Ferrantelli et al., 2003). En outre, cette combinaison neutralise également les virus primaires des clades A, B, C et D *in vitro* (Kitabwalla et al., 2003).

Il a également été démontré qu'une application vaginale de d'anticorps b12 confère une protection chez le macaque (Burton et al., 2011). Cette protection fait intervenir les récepteur Fc. En effet, le transfert passif par intraveineuse de l'anticorps neutralisant b12 et de son mutant LALA incapable de fixer les récepteurs Fcγ dans des macaques infectés par le SHIV par voie vaginale a permis de démontrer une diminution de 50% de l'activité protectrice de l'anticorps LALA comparé à l'anticorps b12 démontrant la participation de la fixation de l'anticorps b12 aux récepteur Fcγ dans la protection contre l'infection (Hessell et al., 2007).

D'autres études ont également démontré la participation des récepteurs Fc dans l'immunisation passive des animaux. Il a en effet été démontré *in vivo* que la protection de singes nouveau-nés contre l'infection orale par le SIV par immunisation passive avec un sérum anti-SIV non neutralisant est fortement corrélée avec l'activité ADCVI présente dans le sérum (Van Rompay et al., 1998). De plus, l'immunisation passive de macaques avec un adénovirus recombinant suivie d'un boost (vaccin sous-unitaire Env) a permis de partiellement protéger les animaux de l'infection muqueuse par le SIV et le SHIV en absence de réponse anticorps neutralisante (Hidajat et al., 2009; Xiao et al., 2010).

Très récemment, il a été démontré qu'une application locale d'une combinaison de ces quatre anticorps neutralisants prévient l'infection par le SHIV des $\frac{2}{3}$ des macaques testés. Au contraire, une combinaison des anticorps non-neutralisants 246-D et 4B3 ne protège pas de l'acquisition du SHIV par voie vaginale mais réduit le pic de la charge virale plasmatique indiquant que ces anticorps sont capable d'inhiber la réplication du VIH de façon Fc-dépendante *in vivo* (Moog et al., 2013).

4. Vaccination

Lors de la découverte du VIH, la secrétaire à la santé américaine de l'époque, Margaret Heckler, prévoit qu'un vaccin contre le virus ne devrait pas être trop difficile à développer, pensant qu'un tel vaccin serait prêt deux ans après cette découverte. Trente ans plus tard, les chercheurs sont encore à la recherche d'un vaccin qui garantirait un degré élevé de protection contre l'infection par le VIH.

4.1. Développement d'un vaccin contre le VIH

Historiquement, la vaccination est la seule stratégie qui ait jamais conduit à l'éradication mondiale d'une maladie d'origine virale. Néanmoins, la biologie du VIH est moins favorable au développement d'un vaccin que d'autres virus. Un vaccin idéal serait peu cher à produire, stable à température ambiante, facile à transporter et à administrer sans équipement spécial, bien supporté et, idéalement, nécessiterait une seule dose pour fournir une protection complète contre toutes voies de transmission et tous les variants du VIH. Cependant, même un vaccin imparfait pourrait offrir des avantages de santé publique.

Différents types de vaccins peuvent être envisagés:

Il pourrait tout d'abord empêcher une personne d'être infecté par le VIH (**vaccination prophylactique stérilisante**).

Ensuite, un vaccin contre le VIH pourrait retarder ou prévenir la progression de la maladie, en dépit de l'infection à VIH (**vaccination prophylactique non stérilisante**). Cela signifie que des individus séropositifs pour le VIH pourraient ne jamais souffrir de déficit immunitaire ou d'une évolution vers le SIDA ou ne le faire que très lentement.

Enfin, ce vaccin pourrait réduire les risques de transmission du VIH, à un partenaire sexuel ou de la mère à l'enfant par exemple ou, également, freiner la progression de la maladie chez le patient vacciné, lui permettant ainsi d'arrêter les thérapies antirétrovirales (**vaccination thérapeutique**).

A l'heure actuelle, il existe différentes stratégies vaccinales contre le VIH:

Les **virus vivants atténués** ou **inactivés** sont considérés comme dangereux après que des recherches sur des singes aient indiqué qu'un vaccin vivant atténué (suppression du gène *nef*) protège contre le SIV mais que le virus retrouve ensuite son pouvoir pathogène initial, causant ainsi un SIDA (Baba et al., 1995; Daniel et al., 1992).

L'utilisation de **protéines recombinantes d'enveloppe** stimulent les anticorps anti-VIH en mimant les protéines de surface du VIH, la gp120 et son précurseur la gp160.

Au lieu de vacciner avec une protéine entière, une autre approche consiste à utiliser un **peptide protéique** se composant de quelques acides aminés. La liaison d'un peptide à un lipide (lipopeptide) a également été explorée comme une technique de vaccin contre le VIH. Le lipide apporte le peptide directement dans les membranes cellulaires où il peut être présenté au système immunitaire avec une efficacité maximale.

Les **vaccins à ADN** sont de petits morceaux d'ADN contenant des gènes du VIH insérés dans des plasmides induisant de fortes réponses T cytotoxiques et T CD4⁺. Après injection, les cellules de l'hôte expriment les gènes du VIH. Cependant, ce système n'est pas bien adapté au modèle primates du fait de la difficulté d'obtention de la dose vaccinale efficace après injection. De plus, des considérations de sécurité inhérentes à la conception des vaccins à ADN existent, le matériel génétique du VIH pouvant entraîner l'infection par le virus. Des vaccins à ADN permettant une production de cytokines en plus des antigènes viraux ont également été testés et montrent que cette approche agit bien chez les singes mais peu chez l'Homme (Boyer et al., 2000).

Les vaccins utilisant des **vecteurs recombinants** sont construits en incorporant des fragments de VIH dans la capsid d'un virus pouvant infecter les cellules en causant peu ou pas de symptômes (adénovirus, canarypox). Ces constructions infectent les cellules et se répliquent entraînant une synthèse des antigènes du VIH qui stimulent le système immunitaire et induit principalement des réponses cellulaires.

Les **réplicons** ont les mêmes propriétés physiques que les virus et les vecteurs viraux, y compris la possibilité de pénétrer dans les cellules de types spécifiques, mais ils ont l'avantage de ne pas se répliquer après être entrés dans la cellule, il y a donc peu ou pas de réponse immunitaire contre le virus porteur du vaccin. Ainsi, un système de réplicon pourrait être utilisé à plusieurs reprises chez le même individu afin de délivrer différents vaccins. Les trois principaux systèmes de réplicons pour les vaccins contre le VIH sont basés sur l'encéphalite équine du Venezuela, virus de la forêt de Semliki, et le virus adéno-associé.

Dernièrement, la recherche s'intéresse au **ciblage des cellules dendritiques** de façon à orienter de manière contrôlée la réponse immunitaire adaptative pour la rendre plus efficace, plus sûre et plus durable. Ainsi, il a été possible d'obtenir une réponse adaptative dirigée contre le pathogène chez le primate suite à une vaccination ciblant les cellules dendritiques (Li et al., 2012).

4.2. Les essais vaccinaux: échecs et espoirs

4.2.1. Essai AIDSVAX

Le premier vaccin contre le VIH à être testé à grande échelle a été le **AIDSVAX**, vaccin à base de protéine recombinante gp120 développé par VaxGen. Il a été conçu pour induire des anticorps neutralisants dans l'espoir de prévenir ou de stopper l'infection par le VIH.

Le premier essai AIDSVAX, débuté en 1998, reposait sur deux isolats différents de virus de sous-type B. Il a été testé chez 5400 individus à risque (90% d'homosexuels) aux États-Unis, au Canada, à Porto Rico et aux Pays-Bas. Le vaccin a été injecté 7 fois sur une période de 30 mois (à 0, 1, 6, 12, 18, 24 et 30 mois) avec des visites de suivi pour les analyses de sang deux semaines après chaque injection et six mois après la dernière injection. Les résultats de l'étude terminée en 2003 ont montré que le AIDSVAX n'a offert aucune protection significative contre l'infection par le VIH dans la population étudiée (Flynn et al., 2005).

Le second essai VaxGen de phase III a débuté en Thaïlande en 1999 utilisant des isolats de virus de «sous-type E» (maintenant classé comme CRF01_AE) et de sous-type B. Cette étude a recruté 2500 utilisateurs de drogues injectables en Thaïlande. Les résultats de l'étude terminée en 2003 n'ont également montré aucune protection du vaccin AIDSVAX B/E.

4.2.2. Essai STEP

La troisième étude à grande échelle réalisée a été l'**essai STEP** (HVTN 502) entre 2004 et 2007 par la société MERCK (Buchbinder et al., 2008). Il s'agissait d'une étude multicentrique internationale, aléatoire, en double aveugle. Le vaccin a été testé sur 3000 volontaires séronégatifs de diverses populations à haut risque, y compris des HSH et des professionnelles du sexe, entre 18 et 45 ans. Le candidat vaccin, un adénovirus (MRKAd5) exprimant les protéines Gag, Pol et Nef de VIH-1 de sous-type B, visait à induire des réponses cellulaires de

type T CD8. Les résultats de l'étude ont montré que le vaccin MRKAd5 n'induisait aucune inhibition de l'infection ni diminution de la charge virale. Au contraire, il permettait une sélection de variant viraux infectieux (Rolland et al., 2011) ainsi qu'une facilitation de l'infection. Le vaccin aurait entraîné la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et facilité leur migration vers les muqueuses intestinales, lieu privilégié de la réplication virale (Benlahrech et al., 2009). Une corrélation entre le titre d'anticorps contre l'adénovirus de type 5 (Ad5), la circoncision et le risque d'infection a été démontrée. En effet, les hommes avec un fort titre d'anticorps Ad5 et n'étant pas circoncis avaient un risque accru d'infection lors de cette étude.

4.2.3. Essai HVTN 505

2500 hommes américains homosexuels, circoncis et ne possédant pas d'anticorps Ad5 ont participé à l'essai de phase IIb **HVTN 505** entre 2009 et 2013 dont la stratégie vaccinale était de type "prime (ADN)-boost (Ad5)". Les exigences sur la circoncision et l'Ad5 ont été mises en place suite à l'essai STEP où il avait été constaté en 2007 une augmentation du nombre d'infections à VIH chez les personnes vaccinées, en particulier ceux qui n'étaient pas circoncis et/ou possédaient des anticorps Ad5. Des résultats intermédiaires ont démontré que le vaccin expérimental n'empêche pas l'infection par le VIH et ne permet pas une réduction de la charge virale chez les vaccinés qui ont ensuite été infectés par le virus. En effet, 41 infections par le VIH sont survenues chez les sujets vaccinés (30 chez les receveurs du placebo) et la charge virale n'a pas été réduite chez 15 des sujets vaccinés ayant été infectés dans les 28 semaines suivant le début de l'étude (15 chez les receveur placebo également). De par ces résultats décevants, l'essai a été stoppé en avril 2013.

4.2.4. Essais PAVE et Phambili

Dans le sillage de l'essai STEP, **PAVE 100**, un essai de phase IIB présentant des similitudes avec le vaccin STEP et impliquant 8500 participants sur 3 continents a été conçu. La stratégie vaccinale était de type "prime (ADN) - boost (Ad5)" utilisé lors de l'essai STEP. Cependant, au vu des résultats préliminaires de l'essai STEP, PAVE 100 a été réduit à un essai d'innocuité.

Tout comme l'essai STEP, l'**essai Phambili** était prévu pour un vaccin Ad5 chez des individus à haut risque en Afrique du Sud. Cependant, il visait à tester le potentiel protecteur du vaccin contre les sous-types B et C du VIH. L'étude a été abandonnée à la suite des résultats de l'essai STEP.

4.2.5. Essais RV144 - essai "Thai" et RV305

L'**essai "Thai"** s'est déroulé de 2003 à 2009. Plus de 16 000 individus issus de provinces à forte prévalence de VIH y ont participé. La stratégie vaccinale était de type "prime-boost": la réponse immunitaire étant tout d'abord préparée par l'administration d'un vecteur recombinant CanaryPox (ALVAC-HIV, Sanofi Pasteur) puis "boostée" par injection de la protéine d'enveloppe gp120 (AIDSVAX B/E). Les résultats de l'essai ont montré une bonne tolérance au vaccin ainsi qu'une diminution significative du taux d'infection de 31,2 % par rapport au placebo (Rerks-Ngarm et al., 2009). Malgré un enthousiasme initial, l'essai RV144 offre une protection en dessous des normes d'homologation d'un vaccin. Étonnamment, il a

été démontré après analyse d'échantillons prélevés deux semaines après la fin de l'immunisation que la capacité de fixation des anticorps IgA à l'enveloppe virale était corrélée avec l'acquisition de l'infection. Au contraire, cette acquisition était inversement corrélée avec la fixation des anticorps IgG aux boucles V1/V2 de l'enveloppe virale (Haynes et al., 2012).

Suite aux résultats encourageant de l'essai RV144, l'**essai RV305** a débuté en avril 2012. Durant cet essai, les volontaires non infectés de l'essai RV144 recevront un rappel tardif avec, soit le même combinaison d'immunogènes que celle utilisée dans l'essai RV144 (ALVAC + l'enveloppe AIDSVAX B/E), soit l'enveloppe AIDSVAX B/E seul, ou ALVAC seul. Le but de cet essais est d'évaluer l'innocuité et la tolérance des rappels tardif chez ces volontaires, d'essayer d'augmenter la réponse immunitaire obtenu dans l'essai RV144 et d'établir un programme de vaccination prime-boost adéquat pour un futur essai. Les résultats sont attendus pour 2014.

De nombreux essais sont actuellement en cours de recherche en phases I et II, la réussite bien que modeste de l'essai RV144 ayant donné une nouvelle dynamique à la recherche vaccinale anti-VIH (IAVI, 2013). Cependant, malgré les nouvelles stratégies en cours d'étude, le développement d'un vaccin efficace contre le VIH semble nécessiter encore de nombreuses années. Les chercheurs s'accordent sur l'importance d'un vaccin combinant une réponse cellulaire et une réponse humorale spécifique La prévention de l'infection des cellules présentatrices d'antigènes, premières cibles du VIH lors d'une infection par voie sexuelle jouant un rôle majeur dans l'immunité, est donc essentielle.

Chapitre 3 : VIH-1 et cellules présentatrices d'antigènes

1. Susceptibilité des cellules présentatrices d'antigènes à l'infection par le VIH-1

1.1. Cellules dendritiques et infection par le VIH-1

Du fait de leur localisation au niveau des muqueuses et de leur capacité à migrer vers les organes lymphoïdes, les cellules dendritiques myéloïdes ont été considérées comme jouant un rôle prédominant dans la transmission et la dissémination du VIH dans tout l'organisme.

1.1.1. Génération de DCs *in vitro* pour l'étude de l'infection à VIH-1

Du fait des faibles proportions des populations DCs *in vivo* (les DCs circulantes représentent 0,5-2% des cellules mononuclées du sang périphérique -PBMCs-, les LCs 2 à 3% des cellules épidermales) (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998; Liu, 2001) et de la difficulté d'obtention des DCs *ex vivo* pour modéliser la fonction immunologique des DCs et étudier leurs interactions avec les VIH, les MoDCs, isolées du sang périphérique, sont couramment utilisés dans les études expérimentales *in vitro*.

1.1.1.1. Cellules dendritiques dérivées de monocytes

Les MoDCs sont générées par différenciation de monocytes CD14⁺ du sang périphérique (représentant 10% des PBMCs) par utilisation de différents cocktails de cytokines pendant 5 à 7 jours.

Ces MoDCs possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de DCs myéloïdes CD11c⁺ immatures. Elles expriment en effet fortement les molécules du CMH II, le CD11c, le CD25 et le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin). Sous l'action de divers stimuli, tels que le lipopolysaccharide, le TNF (Tumor Necrosis Factor), le CD40L et l'interféron γ , les MoDCs mûrissent (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998) entraînant alors des différences de susceptibilités à l'infection par le VIH-1 (Sanders et al., 2002).

1.1.1.2. Cellules dendritiques de Langerhans et interstitielles

Les cellules dendritiques de Langerhans et interstitielles peuvent être obtenues à partir de monocytes du sang périphérique en utilisant une combinaison de cytokines: GM-CSF, TGF- β , IL-13 (Bechetoille et al., 2006) ou GM-CSF, TGF- β , IL-4 (Geissmann et al., 1998). Cependant, les LCs ainsi générées ne possèdent pas les caractéristiques des LCs *in vivo* (faible expression de la langerine et des granules de Birbeck) (Bechetoille et al., 2006).

L'utilisation des cellules souches CD34⁺ isolées à partir du sang de cordon ombilical afin de générer les LCs et IDCs permet de palier ce manque. Dans notre laboratoire, afin d'accroître le nombre de DCs obtenues, les cellules souches CD34⁺ sont tout d'abord amplifiées durant 7 jours dans un milieu contenant les cytokines GM-CSF, SCF, TPO et Fl3t-L. Après cette phase de multiplication, les cellules sont différenciées durant 5 jours en LCs et IDCs en présence de TGF- β 1, TNF- α , et GM-CSF (Peressin et al., 2011). Cependant, cette méthode de

différenciation ne permet pas d'obtenir une culture de LCs, purifiée en absence d'IDCs. Le passage de la culture cellulaire différenciée sur colonne de séparation, afin de purifier les LCs des IDCs, mature les cellules qui ne sont alors plus susceptibles à l'infection par le virus.

Afin de palier à ce problème et d'obtenir une culture de LCs purifiées, les LCs peuvent être isolées de la peau (Peña-Cruz et al., 2001). Les cellules ainsi obtenues sont proches des LCs *in vivo*. Cependant, les traitements utilisés de manière extensive afin de dissocier les cellules de l'organe sont abrasifs et les cellules ainsi obtenues sont le plus souvent matures et s'infectent difficilement avec le VIH de tropisme R5.

1.2.2. Interactions cellules dendritiques - VIH-1

Les DCs circulantes, les IDCs et les LCs expriment des taux relativement faibles du récepteur CD4 et des co-récepteurs CCR5 et CXCR4 dépendamment de leur état d'activation mais sont cependant susceptibles à l'infection par le VIH (Smed-Sørensen et al., 2005). En effet, les DCs immatures expriment préférentiellement le CCR5 et peu le CXCR4 les rendant ainsi plus susceptibles à l'infection par des virus de type R5 que de type X4 (Graneli-Piperno et al., 1998). Au court de leur maturation, l'expression du CXCR4 à la surface des DCs augmente alors que celle du CCR5 diminue permettant leur infection par du virus de tropisme X4.

Par rapport aux cellules T CD4⁺, la réplication du VIH dans les DCs est généralement moins productives (Smed-Sørensen et al., 2005). En outre, *in vivo*, le pourcentage de DCs infectées par le VIH est 10 à 100 fois inférieur à celui de lymphocytes T CD4⁺ infectés (McIlroy et al., 1995). Il a été démontré que, en moyenne, 1 à 3% des DCs circulantes pouvaient être infecté productivement par le VIH *in vitro* (Smed-Sørensen et al., 2005).

Cependant, l'infection des DCs *in vivo* est controversée, des études indiquant l'infection productive des DCs *in vivo* est rare (Cameron et al., 1992). Les faibles taux d'expression des récepteur et co-récepteurs du VIH ainsi que l'expression de facteurs de restriction cellulaire à la surface des DCs (tels que APOBEC3G ou SAMHD1; voir chapitre 2, paragraphe 2.4) peuvent expliquer les faibles taux d'infection des DCs.

Il a été proposé que les LCs seraient les premières cibles du VIH lors d'une transmission sexuelle (Zaitseva et al., 1997). Plus récemment, d'autres ont proposé que ces cellules ne seraient pas ou peu infectées (Saba et al., 2010; van der Vlist and Geijtenbeek, 2010).

Bien que l'on estime que ces DCs soient productrices de faibles quantités de virus *in vivo*, la réplication du virus a été mise en évidence *in vitro* dans des MoDCs (Holl et al., 2006b; Su et al., 2012) ainsi que dans les LCs (Canque et al., 1999; Fahrback et al., 2007; Kawamura et al., 2003; Peressin et al., 2011).

1.2. Infection des macrophages par le VIH-1

1.2.1. Génération des macrophages *in vitro*

L'étude des macrophages est souvent délicate de part leur accessibilité limitée dans les tissus, des méthodes d'obtention *ex vivo* inefficaces et la non prolifération des macrophages en culture. Ainsi, la plupart des études *in vitro* utilise des macrophages dérivés de monocytes (MDMs) obtenus par différenciation des monocytes du sang périphérique. Les monocytes peuvent être

obtenus par adhérence, élutriation centrifuge ou sélection positive des cellules CD14⁺ du sang périphérique.

1.2.2. Susceptibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1

Il y a plus de 25 ans, les macrophages ont été décrits comme portant des marqueurs d'infection productive par le VIH-1 *in vivo* (Koenig et al., 1986).

En raison de leur localisation dans différents tissus et de la capacité des monocytes à migrer dans pratiquement tous les organes, notamment le cerveau, avant de se différencier en macrophages, ils pourraient contribuer à la propagation du VIH-1 chez le patient (Gras and Kaul, 2010; Schnell et al., 2011; Soulas et al., 2011). Par ailleurs, les macrophages du lait maternel, cellules majoritaires du colostrum, ont été décrits comme cellules clés dans la transmission de la mère à l'enfant lors de l'allaitement du fait de leur expression de DC-SIGN (Yagi et al., 2010). En outre, le VIH-1 a développé des mécanismes afin de prolonger la durée de vie des macrophages infectés (Reynoso et al., 2012; Swingler et al., 2007) qui sont beaucoup plus résistants aux effets cytopathiques de la réplication virale que les cellules T CD4⁺ activées (Igarashi et al., 2001; Perelson et al., 1996; Swingler et al., 2007). Ainsi le VIH induit une activité télomérase dans les macrophages conduisant à la protection des cellules contre le stress oxydatif ainsi qu'une dérégulation du récepteur TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) et une régulation positive des gènes anti-apoptotique bfl-1 et mcl-1 par le M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Les macrophages peuvent donc "héberger" le virus pendant de longues périodes, constituant ainsi des réservoirs du VIH-1 et un obstacle majeur à l'éradication du virus chez les individus infectés.

2. Cellules présentatrices d'antigènes et VIH-1: de l'infection à la dissémination

De nombreuses études ont suggéré que le SIV peut rapidement pénétrer la muqueuse vaginale après une exposition virale, puis infecter ou s'associer avec des DCs intra-épithéliales, lesquelles pouvant intervenir dans la transmission du virus aux cellules T CD4⁺ (Hu et al., 2000; Hu et al., 1999; Spira et al., 1996). Il a été démontré dans une étude utilisant des explants cervicaux exposés au VIH que les MoDCs migratoires du tissu cervical participent à hauteur de 90% dans la dissémination du virus (Hu et al., 2004). Ces résultats suggèrent que les DCs peuvent jouer un rôle important dans la transmission du VIH. Les LCs ont été proposées comme étant les premières cibles du VIH lors d'une transmission par voie sexuelle. Outre les DCs immatures, les macrophages résidant dans la muqueuse vaginale sont également les cibles du VIH *in vivo* (Shattock and Moore, 2003).

Ces APCs sont non seulement infectées par des particules virales mais ont été décrites également comme capables de transférer efficacement ces particules aux lymphocytes T CD4⁺ et joueraient donc un rôle primordial dans l'infection et la dissémination du virus dans l'organisme. Depuis de nombreuses années, il est estimé que le transfert du VIH-1 de cellule à cellule est 100 à 1000 fois plus efficace que l'infection par du virus libre (Dimitrov et al., 1993).

2.1. Mécanismes de transfert du VIH-1 des cellules dendritiques aux cellules T

Les mécanismes de transfert du VIH des DCs aux lymphocytes T CD4⁺ ont été étudiés sans être toutefois clairement élucidés. Deux modes de transfert du VIH des MoDCs aux cellules T CD4⁺ ont été décrits: le transfert en *trans* durant lequel le virus n'est pas répliqué mais directement transmis aux lymphocytes T et le transfert en *cis* au cours duquel les cellules dendritiques sont infectées productivement. Il a été proposé que ces deux modes de transmissions ne sont pas des mécanismes dépendants. En effet, durant les premières 24 heures suivant l'infection des DCs, le virus serait transféré en *trans* aux lymphocytes T CD4⁺ puis, dans les jours suivants, le transfert en *cis* s'effectuerait (Turville et al., 2004).

2.2.1. La synapse virologique

Il a été démontré qu'un contact cellulaire entre la MoDC et la cellule T est nécessaire pour un transfert de virus efficace au lymphocyte T (Tsunetsugu-Yokota et al., 1997). Une synapse virologique se forme au niveau du contact entre les DCs et les cellules T CD4⁺. Cette synapse est structurellement similaire à la synapse immunologique formée durant la réponse immunitaire mais possède des caractéristiques morphologiques et dynamiques différentes (Vasiliver-Shamis et al., 2010). La formation de la synapse virologique fait intervenir des interactions entre des molécules d'adhésion (Jolly et al., 2007; Wang et al., 2009) et le recrutement de récepteurs et co-récepteurs du VIH-1 (McDonald et al., 2003). L'architecture tridimensionnelle de la synapse virologique formée entre les MoDCs matures et les cellules T CD4⁺ a été visualisée par microscopie électronique à balayage et tomographie électronique (Felts et al. 2010). Cette visualisation a révélé que le VIH-1 est localisé dans des invaginations (ou compartiments) profondes, contigües avec la surface des DCs. En outre, deux types de contacts distincts entre les MoDCs et les cellules T CD4⁺ au niveau de la synapse virologique ont été observés. Durant le premier type de contact, des projections d'actine de la MoDC permettent des extensions membranaires couvrant ainsi le lymphocyte T CD4⁺. Le second type de contact fait intervenir des extensions filopodiales des cellules T CD4⁺ atteignant et pénétrant les compartiments de la MoDC, contenant le virus, contigus à la surface de la MoDC. Ces observations démontrent que les contacts cellule-cellule impliquent des réorganisations des membranes cellulaires et du réseau du cytosquelette importantes afin de permettre un transfert efficace du VIH-1.

2.1.2. Le transfert en *trans*

Lors du transfert en *trans* le virus est capturé par une lectine de type C exprimée à la surface de la DC n'induisant pas la fusion du VIH-1 dans la DC et ne conduisant donc pas à l'infection productive de la DC. Divers modèles de transfert en *trans* ont été proposés.

2.1.2.1. Transfert direct du virus

Lors de la transmission du VIH-1 en *trans* (absence de réplication) *via* la synapse virologique (Garcia et al., 2005; McDonald et al., 2003; Turville et al., 2004), le virus fixé au DC-SIGN ou une autre lectine de type C est concentré à la surface de la DC. Un contact étroit entre la DC infectée et la cellule T CD4⁺ permet la formation de la synapse virologique et un transfert

efficace du VIH-1 aux cellules T CD4⁺ (McDonald et al., 2003). Ce transfert se fait directement sans formation d'exosomes (voir ci-dessous)

2.1.2.2. Transfert par la voie de sécrétion des exosomes

Les exosomes sont des vésicules libérées par les cellules afin de transmettre des molécules de signalisation entre cellules. Dans ce modèle, le virus utilise la DC comme un cheval de Troie afin d'échapper au système immunitaire et favoriser la propagation de l'infection.

Il a en effet été démontré que les particules virales capturées par les DCs immatures pouvaient être transférées aux cellules T CD4⁺ par exocytose (Wiley and Gummuluru, 2006). Après endocytose du VIH-1, les particules virales sont localisées dans des compartiments riche en tétraspanine présumés être des corps multi-vésiculaires (MVBs) (Garcia et al., 2005). Les particules virales sont alors adressées directement à la voie de sécrétion des exosomes afin d'être libérées dans le milieu extracellulaire en association avec les exosomes (Wiley and Gummuluru, 2006). Il est supposé qu'afin d'échapper à la dégradation lysosomale, les particules virales fusionnent avec la membrane du MVB les contenant.

Le VIH serait donc endocyté par les DCs (en l'absence d'infection productive de celles-ci), maintenu infectieux dans un compartiment endosomal à faible pH, puis redirigé et délivré au niveau de la synapse virologique après le contact avec un lymphocyte T (figure 18A) (Kwon et al., 2002). Ce sont alors les virions infectieux, intacts, précédemment endocytés qui sont libérés des DCs et non des virions nouvellement produits par les DCs (Wiley and Gummuluru, 2006). Le pouvoir infectieux des virus associés aux exosomes est dix fois plus élevé que l'infection par le virus libre (Wiley and Gummuluru, 2006).

En outre, ce transfert a été récemment contesté. En effet, l'utilisation de CD4 soluble (sCD4) permet d'inhiber le transfert en *trans* entre les DCs et les cellules T CD4⁺ suggérant que la virus est encore accessible aux anticorps et donc non protégé dans des compartiments intracellulaires et que la voie d'endocytose du virus conduit uniquement à sa dégradation (figure 18B) (Cavrois et al., 2007).

Afin de concilier les modèles de Kwon et de Cavrois, Yu et al., ont proposé un modèle dans lequel les virions fixés à la surface de la DC par des récepteurs alternatifs seraient présents dans des invaginations encore accessible aux inhibiteurs et anticorps mais assez profondes pour qu'une localisation intracellulaire du virus apparaisse en microscopie (figure 18C) (Yu et al., 2008).

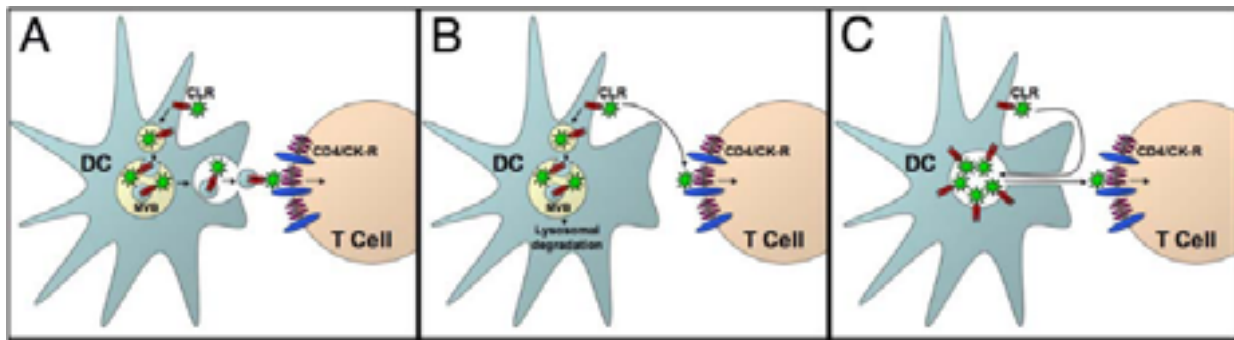


Figure 18. Modèles de transfert du VIH-1 en *trans* des DCs aux lymphocytes T CD4. [A] Modèle des exosomes selon Kwon *et al.*, (Kwon *et al.*, 2002). [B] Modèle proposé par Cavrois *et al.*, (Cavrois *et al.*, 2007). [C] Modèle de conciliation proposé par Yu *et al.*, (Yu *et al.*, 2008). (Modifié d'après (Yu *et al.*, 2008)).

La fixation du VIH-1 aux récepteurs alternatifs lors du transfert en *trans* conduisant souvent à une dégradation du virale, le virus peut également être transféré en *cis*.

2.1.3. Le transfert en *cis*

Lors du transfert en *cis*, le virus entre dans la DC par fusion après fixation au récepteur CD4 et un co-récepteur (CCR5 ou CXCR4) exprimés à la surface de la DC. Après 24 heures, les virions nouvellement produit par les DCs sont transmit aux cellules T *via* la synapse virologique ou après migration sur des filopodes. Ainsi, le transfert en *cis*, se déroulant de 24 à 72 heures suivant l'infection, implique la production *de novo* de virions par les cellules dendritiques.

Il a en outre été décrit que la production virale est accentuée dans les MoDCs en contact avec des lymphocytes T CD4 (Holl *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2012). Cette augmentation de la réplication du VIH dans les MoDCs favoriserait également un transfert du virus en *cis*.

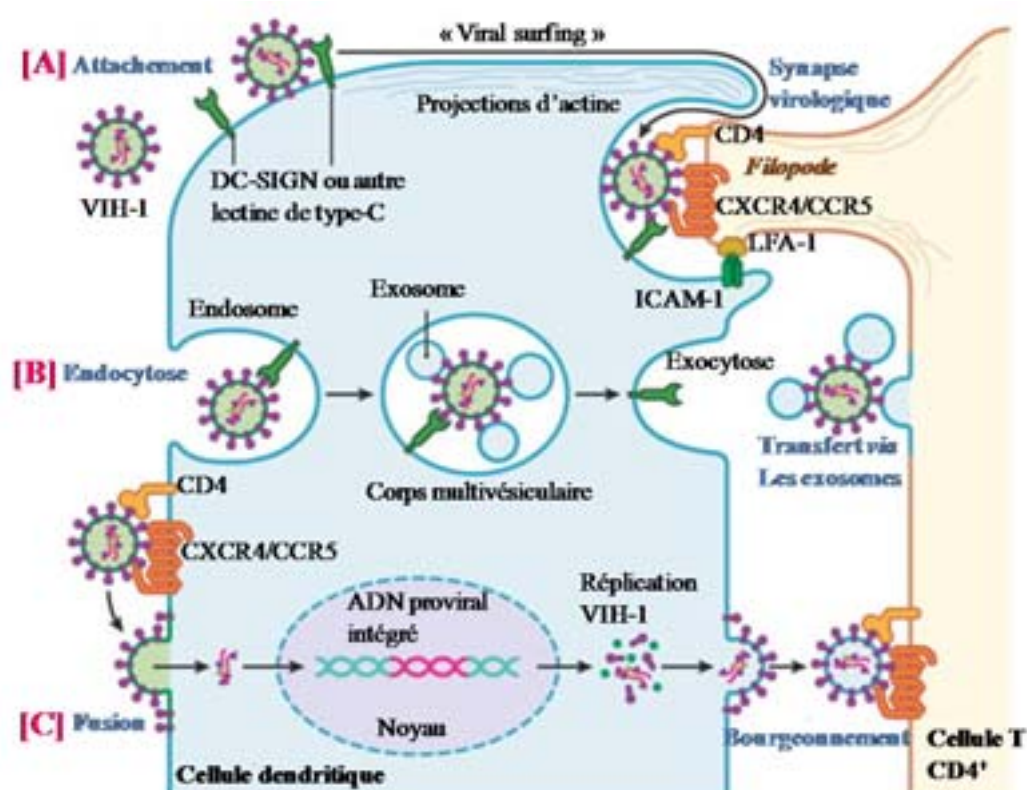


Figure 19. Mécanismes de transmission du VIH-1 des cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4⁺. Le virus peut être transmis des DCs aux cellules T CD4⁺ par trois mécanismes distincts. **[A]** Le transfert direct en *trans* via la synapse virologique: le VIH-1 se lie au DC-SIGN ou une autre lectine de type C à la surface de la DCs, "surfe" le long de projections d'actine et se place dans une structure en forme de poche à la surface de la cellule. Lors du contact entre la DC et la cellule T CD4⁺, la synapse virologique se forme et est stabilisée par des interactions entre ICAM-1 et LFA-1. Le lymphocyte T CD4⁺ étend un filopode (réarrangements du cytosquelette d'actine) dans la structure en poche de la DC afin de capturer le VIH-1. **[B]** Le transfert en *trans* par la voie de sécrétion des exosomes: endocytose du VIH-1 dans les corps multivésiculaires. Le virus peut alors être exocyté associé à des exosomes et infecter les lymphocytes T CD4⁺ à proximité. **[C]** Transfert en *cis*: le virus entre dans la DC par fusion et se réplique. Les virions infectieux nouvellement produit (virion avec une membrane bleue sur le schéma) bourgeonnent hors de la DC et sont capables d'infecter les lymphocytes T CD4⁺ après migration le long de filopodes ou *via* la synapse virologique (modifié d'après (Coleman, 2013)).

2.1.4. Transfert du virus des cellules de Langerhans aux lymphocytes T CD4⁺

Contrairement au transfert du VIH-1 des MoDCs aux cellules T CD4⁺, le transfert du virus des LCs aux lymphocytes T CD4⁺ est plus controversé. En effet, certains ont démontré un transfert en *trans* de virus de tropisme X4 de LCs aux cellules T CD4 (Fahrbach et al., 2007) alors que Kawamura et ses collègues ont montré une absence de transfert de virus X4 en *trans* et en *cis*, le virus de tropisme R5 étant transféré efficacement en *cis* des LCs aux lymphocytes T CD4 (Kawamura et al., 2008). Ces différences observées pour le virus X4 pourraient s'expliquer par le type de LCs utilisées (différenciées à partir de cellules souches CD34⁺ du sang de cordon ombilical (Fahrbach et al., 2007) *versus* isolées de la peau (Kawamura et al., 2008)), le type de virus (isolats primaires (Kawamura et al., 2008) *versus* pseudovirus (Fahrbach et al., 2007)), les

méthodes de détection (microscopie (Fahrbach et al., 2007) *versus* cytométrie en flux (Kawamura et al., 2008)).

2.2. Transfert du VIH-1 des macrophages aux lymphocytes T CD4⁺

Contrairement au transfert entre les MoDCs et les cellules T CD4⁺, la transmission du virus des macrophages aux lymphocytes T CD4⁺ a été relativement peu étudiée. Dès 1999, il a été démontré un transfert rapide du VIH-1 entre des macrophages infectés et des PBLs non infectés nécessitant un contact direct entre les cellules et étant plus efficace qu'une infection par le virus libre (Carr et al., 1999). Plus récemment, une étude a démontré que les MDMs forment une synapse virologique afin de transférer le VIH-1 aux lymphocytes T (Groot et al., 2008). Un MDM infecté pouvant transférer *en cis* le virus à au moins une cellule T toutes les 6 heures *via* une synapse virologique se formant de façon transitoire (Groot et al., 2008).

Dans les MDM infectés, il a été démontré que la protéine Gag s'accumule dans des compartiments riche en tétraspanines suggérant ainsi un réservoir viral. Cependant, lorsque les MDMs sont co-cultivés avec des lymphocytes T CD4⁺ et qu'une synapse virologique se forme, la protéine Gag, contenue dans les compartiments, migrent rapidement (5-10 minutes) jusqu'à la synapse afin d'être transférée efficacement aux cellules T (Gousset et al., 2008).

Outre le fait que seule une étude a démontré un transfert du VIH-1 des macrophages aux cellules T CD4, elle ne traite pas du transfert précoce du virus *in trans*. En effet, dans cette étude, les macrophages sont déjà infectés par le virus et ne permet donc pas l'analyse du transfert *in trans* qui est impliqué dans les étapes précoces de la dissémination virale.

2.3. Rôle des récepteurs alternatifs dans l'infection des cellules présentatrices d'antigènes et le transfert du virus

Outre la molécule de CD4, récepteur du VIH-1, et les co-récepteurs CXCR4 et CCR5, d'autres récepteurs exprimés à la surface des APCs interagissent avec la gp120 du virus. Ces récepteurs alternatifs peuvent lier les particules virales favorisant ainsi les interactions avec le CD4 et / ou les co-récepteurs et sont impliqués dans un transfert viral.

2.3.1. La langerine

Le rôle de la langerine, exprimée spécifiquement à la surface des LCs, dans l'infection des LCs est controversé. En effet, il a été décrit que le VIH pouvait être transféré *in trans* (voir paragraphe 2.1.2) des LCs aux lymphocytes T CD4⁺ après sa fixation sur la langerine (Fahrbach et al., 2007). D'autres, au contraire, proposent que la langerine interviendrait dans la dégradation du virus après internalisation dans les granules de Birbeck, exclusivement présentes dans les LCs (de Witte et al., 2007b; van der Vlist and Geijtenbeek, 2010). Enfin, d'autres encore suggèrent que la langerine ne devrait pas être considérée comme un récepteur alternatif du VIH car elle ne participerait pas à l'infection des LCs (Kawamura et al., 2003; Kawamura et al., 2008; Peressin et al., 2011).

2.3.2. Le DC-SIGN

Le DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), peu exprimé à la surface des **LCs**, **IDCs** et **MDMs** mais fortement exprimé par les **MoDCs**, est considéré comme un récepteur alternatif de choix, de par sa forte affinité pour la gp120, ainsi que par sa capacité à rapprocher le VIH du CD4 et du corécepteur. Il est décrit comme intervenant dans la fixation suivie de l'endocytose du virus, l'infection productive des cellules dendritiques, et dans le transfert du virus des cellules dendritiques vers les lymphocytes T (Nobile et al., 2003). En effet, la surexpression du DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques promeut l'entrée du VIH-1 dans les DCs et leur infection (Lee et al., 2001). La liaison du virus au DC-SIGN déclenche une cascade de signalisation favorisant la réplication du VIH-1 dans les DCs (Gringhuis et al., 2010). Après capture par le DC-SIGN, le VIH-1 internalisé par endocytose est majoritairement dégradé par le protéasome. Cependant, certains virions échappent à la dégradation et sont redirigés vers des compartiments intracellulaires non-lysosomiaux et peuvent être transférés aux cellules T CD4 (Geijtenbeek et al., 2000; Kwon et al., 2002).

2.3.3. Les siglecs

Les siglecs (*Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*) sont des lectines de type I exprimées à la surface des cellules immunitaires. La siglec-1 (CD169) exprimée par les **MoDCs** et les **MDMs** (pas ou peu exprimé à la surface des **LCs** et **IDCs**) a été récemment décrite comme essentielle pour la capture du VIH-1 par les MoDCs de par sa liaison avec le ganglioside GM3 (glycosphingolipide contenant des acides sialiques) présent dans la bicouche lipidique du virus (Puryear et al., 2013). En outre, le virus utilisent également cette liaison acides sialiques/siglec-1 afin de faciliter sa fixation aux macrophages et d'améliorer ainsi sa liaison au CD4 (Zou et al., 2011).

2.3.4. Le DCIR

La molécule de DCIR (*DC immunoreceptor*) est une lectine de type C peu étudiée. Elle est fortement exprimée à la surface des **MoDCs** et des **MDMs** mais est peu exprimée par les **LCs** (Bates et al., 1999). Le DCIR a été décrit comme récepteur du VIH-1 grâce à sa région "neck" à la surface de la MoDCs immature et est impliqué dans la transmission du VIH-1 des MoDCs aux cellules T en *trans* et en *cis* (Lambert et al., 2008).

2.3.5. Le récepteur au mannose

Le récepteur au mannose est une lectine de type C dont la fonction est de reconnaître des mannoses exprimés à la surface de particules étrangères. Il est fortement exprimé à la surface des **MDMs**, des **IDCs** et de **MoDCs** et lie, *via* son domaine carbohydrate, la gp120 du VIH-1. La capture du virus par le récepteur au mannose facilite l'entrée virale par fusion et peut fournir une voie naturelle pour la dégradation du VIH par la voie endolysosomal dans les MoDCs (Turville et al., 2003). Il a été également démontré que l'infection par le VIH est liée à une diminution de l'expression du récepteur au mannose à la surface des macrophages alvéolaires (Koziel et al., 1998) et qu'il joue un rôle dans le transfert du virus des macrophages aux cellules T (Nguyen and Hildreth, 2003).

2.3.6. Les syndécanes

La faible expression du CD4 à la surface des macrophages est insuffisante pour médier l'attachement du VIH. Les syndécanes 1, 2 et 4, des protéoglycane héparane sulfate (HSPGs), sont fortement exprimé sur les **MDMs** (pas ou peu à la surface des **LCs** et **IDCs**) et sont nécessaire à l'attachement du virus sur ces cellules, compensant ainsi le faible taux de CD4 (Saphire et al., 2001). Au contraire, des macrophages, les **MoDCs** immatures, les **LCs** et les **IDCs** expriment fortement le syndécane 3. Ces HSPGs ont également la capacité de capturer, *via* leur chaîne héparane sulfate, le virus à la surface de cellules (Bobardt et al., 2003) et de le transférer efficacement en *trans* des DCs aux cellules T CD4⁺ (de Witte et al., 2007a). Ils concentrent également les virus à la surface de macrophages augmentant alors les probabilités d'interaction entre les particules virales et les molécules de CD4 (Saphire et al., 2001).

3. Inhibition par les anticorps de l'infection des cellules présentatrices d'antigènes et du transfert du VIH-1 aux cellules T CD4⁺

3.1 Neutralisation de l'infection des cellules présentatrices d'antigènes

Les anticorps neutralisants sont capable d'inhiber efficacement la réplication virale dans les MoDCs infectées par du virus libre par deux mécanismes distincts: neutralisation du pouvoir infectieux *via* la partie Fab des immunoglobulines G et inhibition faisant intervenir le domaine Fc des IgG et les récepteurs Fcγ présents à la membrane cellulaire des MoDCs. Ainsi, le virus opsonisé par les anticorps serait détruit dans un compartiment endo-lysosomal après internalisation des complexes immuns fixés *via* les récepteurs Fcγ. En outre, les anticorps non-neutralisants inhibiteurs, incapables de neutraliser les isolats primaires lors de l'infection de lymphocytes par le virus libre, ont également la capacité d'inhiber efficacement la réplication virale dans les macrophages et les MoDCs (Holl et al., 2006a).

Une inhibition de l'infection efficace par les anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs dans les LCs et IDCs comparable à celle observée dans les MoDCs a été observée (Peressin et al., 2011).

Dans la plupart des cellules, le VIH-1 s'assemble au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Il a néanmoins été démontré que dans les macrophages les virus s'assemblent dans des compartiments "endosome-like" relié à la membrane plasmique du macrophages par des petit canaux (Welsch et al., 2007) permettant ainsi aux compartiments d'être accessibles à l'environnement extracellulaire. Cette liaison permettrait aux anticorps d'atteindre les compartiments d'assemblage du VIH-1 et ainsi d'inhiber efficacement le virus. Cependant, d'autres études suggèrent, qu'au contraire, ces compartiments contenant le virus ne seraient pas accessible aux anticorps et aux petites molécules et seraient donc des obstacles à l'élimination du réservoir viral (Chu et al., 2012; Koppensteiner et al., 2012).

3.2. Inhibition du transfert du VIH-1 aux lymphocytes T CD4⁺ par les anticorps

L'activité inhibitrice des anticorps sur le transfert du VIH est controversée. Les divergences dans les données résultent en grande partie des différences dans les méthodes expérimentales utilisées: utilisation de lignées cellulaires ou de cellules primaires, infection par des isolats primaires ou des pseudovirus, méthodes de détection du transfert différentes (cytométrie en flux, immunofluorescence, PCR) et, surtout, étude des étapes précoces ou tardives du transfert. Au regard du tableau 2 résumant les connaissances sur l'inhibition du transfert par les anticorps neutralisants précédemment décrits (inhibition par l'anticorps en vert, absence d'inhibition en rouge), la controverse existant sur l'efficacité des anticorps dans le transfert du VIH-1 des APCs aux cellules T CD4 réside majoritairement dans l'étape de transfert étudiée. En effet, les différentes équipes s'accordent sur l'activité inhibitrice des anticorps sur les étapes tardives du transfert du virus (blocage de l'infection productive de la cellule cible), tous les anticorps neutralisants testés inhibant l'infection de la cellule cible. De même, à l'exception de l'anticorps neutralisant 2G12, les différents résultats d'inhibition des étapes précoces du transfert (formation de la synapse virologique) concordent: les anticorps neutralisants anti-gp41 2F5 et 4E10 n'ont pas d'activité inhibitrice au contraire de l'anticorps neutralisant anti-gp120 b12 qui inhibe la formation de la synapse virologique dans les différentes études réalisées. Certaines équipes considèrent donc que les anticorps 2F5 et 4E10 n'ont pas d'efficacité dans le transfert alors qu'ils seront actifs dans l'inhibition du transfert selon d'autres, créant ainsi une discorde.

A l'heure actuelle, nous ne disposons que de très peu de données sur l'activité des anticorps sur le transfert (précoce et tardif) du VIH-1 des APCs primaires aux cellules T CD4 primaires, la majorité des études ayant été réalisées sur des lignées cellulaires et ne reflétant donc pas la physiologie de l'infection.

Donneur	Cible	Virus	Méthode de détection	Effet sur le transfert		Références
				Étapes précoces (étude de la formation de la VS)	Étapes tardives (analyse de l'infection de la cellule cible)	
Lignées cellulaires						
MOLT	CD4	Virus primaire	CF	2G12, b12 2F5, 4E10		(Sánchez-Palomino et al., 2011)
			CF et PCR	b12, 2F5, 4E10	2F5, 4E10, b12	(Massanella et al., 2009)
Jurkat	Jurkat	Virus primaire	PCR		2G12, b12, 2F5	(Martin et al., 2010)
Jurkat	MT4 et CD4	Pseudovirus et virus primaire	CF		sCD4, b12, 2G12, 2F5, 4E10	(Durham et al., 2012)
		Pseudovirus		sCD4, b12, 2F5		(Chen et al., 2007)
PBMCs	TZM-bl	Virus primaire	IF		2F5, 4E10, 2G12, VRC01, b12	(Abela et al., 2012)
MoDCs	HOS-CD4	Pseudovirus	IF		sCD4	(Yu et al., 2008)
MoDCs	TZM-bl et CD4	Virus primaire	IF		VRC01, b12, 2G12, 2F5, 4E10, PG16	(Sagar et al., 2012)
Raji-DC-SIGN et MoDCs	CD4	Pseudovirus	CF	b12 4E10, 2F5, 2G12	2F5	(van Montfort et al., 2007)
Cellules primaires						
MoDCs et LCs	PBLs	Virus Primaire	CF		sCD4	(Cavrois et al., 2007)
MoDCs	CD4	Virus primaire	CF	b12, 2F5	2F5, b12	(Ganesh et al., 2004)
					VRC01, VRC03, b12, 2G12, 2F5, 4E10	(Su et al., 2012)
MDMs	CD4	Aucunes données à ce jour				

Tableau 2. État des connaissances sur l'inhibition du transfert du VIH-1 de cellule à cellule par les anticorps. VS = synapse virologique, CD4 = cellules T CD4 primaires, MoDC = cellules dendritique dérivées de monocytes, LC = cellules dendritique de type Langerhans, PBL = lymphocytes du sang périphérique, MDM = macrophage dérivés de monocytes, Raji-DC-SIGN = lignée cellulaire Raji exprimant la molécule de DC-SIGN, HOS-CD4 = lignée humaine d'ostéosarcome exprimant la molécule de CD4, IF = immunofluorescence, CF = cytométrie en flux. Rouge: pas d'inhibition par l'anticorps. Vert: inhibition par l'anticorps.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

La transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses sexuelles joue un rôle critique dans la pathogénèse virale et définir les mécanismes de cette transmission est primordial dans le développement de stratégies permettant de combattre le VIH-1. Les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques de type Langerhans et interstitielles) sont considérées comme les premières cibles du virus dans la muqueuse vaginale et l'inhibition de leur infection et du transfert aux lymphocytes T CD4 constitue une priorité dans la lutte contre l'infection par le VIH-1.

De nombreuses études ont été réalisées sur le transfert du virus des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs) aux cellules T CD4. De manière intéressante, ces MoDCs ont été décrites comme transférant efficacement *in vitro* en *trans* (absence d'infection des APCs) et en *cis* (infection productive des APCs) le VIH aux lymphocytes T CD4, cibles principales du virus. Ce transfert de cellule à cellule, extrêmement efficace, faciliterait la dissémination du virus dans l'organisme. Il serait donc particulièrement important de l'inhiber. L'efficacité des anticorps neutralisants à inhiber ce transfert ont été récemment décrit dans l'équipe (Su et al., 2012).

Cependant, peu d'études ont analysé le transfert du VIH-1 des cellules dendritiques de types Langerhans (LCs) et interstitielles (IDCs) ou des macrophages (MDMs), cellules présentes au niveau des muqueuses lors de la transmission du VIH par voie sexuelle, aux lymphocytes T CD4. Enfin, l'inhibition de ce transfert par les anticorps n'a pas été analysée.

Dans ce contexte, les objectifs de mon étude ont été (i) de déterminer les mécanismes de transfert en *cis* et en *trans* du VIH-1 d'APCs (macrophages et cellules dendritiques de type Langerhans et interstitielles) présentes dans les muqueuses aux lymphocytes T CD4 primaires et (ii) d'étudier l'activité inhibitrice des anticorps sur ce transfert.

Les travaux de thèse comparant les mécanismes de transfert du VIH-1 de différentes cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques de types Langerhans et interstitielles et macrophages) aux lymphocytes T CD4 sont présentés sous la forme d'un manuscrit en soumission (Manuscrit 1). L'étude de l'activité des anticorps sur le transfert du virus des macrophages aux lymphocytes du sang périphérique est exposée sous la forme d'un manuscrit en cours de rédaction (Manuscrit 2). Enfin, l'étude des capacités inhibitrices des anticorps sur le transfert du VIH-1 des MoDCs aux cellules T CD4 à laquelle j'ai contribué au sein de l'équipe du Dr Christiane Moog est présentée en annexe (Publication 1).

RÉSULTATS

MANUSCRIT 1

Transfert efficace du VIH-1 en *trans* et en *cis* des cellules dendritiques de type Langerhans et des macrophages aux lymphocytes T autologues

Efficient transfer of HIV-1 in *trans* and in *cis* from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T lymphocytes

Maryse Peressin, Alizé Proust, Sylvie Schmidt, Bin Su, Melanie Lambotin, Marina E Biedma, Géraldine Laumond, Thomas Decoville, Vincent Holl et Christiane Moog

Publication soumise: AIDS, 2013

Les mécanismes de transfert du VIH-1 des cellules dendritiques dérivées de monocytes ont été étudiés précédemment au laboratoire. Afin de nous rapprocher des conditions de transfert du VIH dans les muqueuses, nous avons généré des cellules dendritiques de type Langerhans et interstitielles (LCs/IDCs) et des macrophages dérivés de monocytes (MDMs). Nous avons analysé le transfert du VIH-1 aux lymphocytes T par ces cellules présentatrices d'antigènes présentes dans les muqueuses.

Nous avons démontré que ces APCs transfèrent le VIH-1 efficacement aux cellules T CD4 selon deux mécanismes distincts: les LCs/IDCs transfèrent le virus aux lymphocytes T CD4 majoritairement en *cis* alors que les MDMs transfèrent le VIH-1 en *trans* et en *cis* dans des proportions similaires. La capacité de fusion du VIH dans les APCs est plus faible en présence de cellules T CD4 qu'en absence de celles ci, suggérant des modifications du processus d'infection des APCs en présence de lymphocytes T. En outre, la fusion des virions est plus rapide dans les MDMs et les anticorps neutralisants inhibent plus efficacement le transfert du VIH-1 à partir des MDMs que des LCs/IDCs.

Cette étude montre les contributions majeures de différents types de cellules présentatrices d'antigènes présentes dans la muqueuse dans la dissémination du virus dans l'organisme et suggère que le virus détourne les propriétés de ces cellules afin de faciliter sa dissémination. Les macrophages transmettraient le virus en *trans* rapidement aux lymphocytes T CD4 recrutés au niveau de la porte d'entrée du virus. Par la suite, les LCs et IDCs qui ont capturé le VIH participeraient à la dissémination du virus plus tardivement suite à leur migration dans les organes lymphoïdes.

Efficient transfer of HIV-1 in *trans* and in *cis* from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T-lymphocytes

Maryse PERESSIN ^{1*}, Alizé PROUST ¹, Sylvie SCHMIDT ¹, Bin SU ¹, Mélanie LAMBOTIN ¹, Marina E. BIEDMA ¹, Géraldine LAUMOND ¹, Thomas DECOVILLE ¹, Vincent HOLL ^{1, 2} and Christiane MOOG ^{1*}.

¹ INSERM UMR 1110, Fédération de Médecine Translationnelle, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

² COVANCE, Lab Science Department, Hematology and Flow Department, Covance CLS SA, 7 rue Moise-Marcinhes, CH-1217 Meyrin, Geneva, Switzerland

*** Corresponding authors:**

Dr. Christiane Moog

INSERM U1110

Tel. +33 (0)368853742

Fax. +33 (0)368853724

e-mail: c.moog@unistra.fr

Dr. PERESSIN Maryse

INSERM U1110

Tel. +33 (0)368853701

Fax. +33 (0)368853724

e-mail: maryse.peressin@unistra.fr

Running title: Antigen presenting cells transfer HIV to T-cells

Words: 3452

Supports: This project was supported by funds from EuroNeut 41 (FP7-HEALTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Sidaction, Fondation Dormeur, fonds de dotation Pierre Bergé and ANRS grants. M.P was supported by EuroNeut41 grants.

Abbreviations used : HIV, human immunodeficiency virus; AZT, azidothymidine; APCs, antigen-presenting cells ; LCs, Langerhans dendritic cells; IDCs, interstitial DCs; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; MDMs, monocyte-derived macrophages ; NAb, neutralizing antibody.

Abstract

Objective: The chronology of HIV infection in mucosal tissue after sexual transmission is unknown. Several potential HIV targets cells are present at these sites, including dendritic cells (DCs), macrophages and CD4 T-lymphocytes. DCs and macrophages are antigen-presenting cells (APCs) and are thus involved in crosstalk with T-cells. This close contact may favor efficient HIV-1 transfer to T-lymphocytes, resulting in rapid HIV-1 dissemination.

Design: We investigated the role of APCs in HIV transfer to T-cells by incubating Langerhans DCs and interstitial DCs (LCs/IDCs) or monocyte-derived macrophages (MDMs) with HIV for 2 hours before addition of uninfected autologous CD4 T-lymphocytes.

Methods: HIV infection was recorded after different time points. Following staining, the measurement of intracellular p24 in the different cell populations was analyzed by flow cytometry.

Results: We showed that LCs/IDCs and macrophages efficiently transferred HIV to CD4 T-cells. Interestingly, a rapid HIV transfer in *trans* predominated in MDMs, whereas *cis* transfer mainly occurred in LCs/IDCs cocultures. Neutralizing antibody 2G12, added to HIV-loaded APCs, efficiently blocked both the *trans*- and the *cis*-infection of T-cells.

Conclusions: These findings highlight the major contributions of various mucosal cells in HIV dissemination and suggest that HIV hijacks the different properties of APCs to favor its dissemination through the body. They emphasize the role of macrophages in the rapid transmission of HIV to T-lymphocytes at mucosal sites, DCs being prone to migrate to lymphoid organ for subsequent dissemination by *cis*-transfer.

Keywords: HIV, cell-to-cell transfer, Langerhans dendritic cells, macrophages, lymphocytes

Introduction

Following sexual mucosal transmission, Langerhans dendritic cells (LCs), interstitial DCs (IDCs), macrophages and T-lymphocytes residing in mucosal and submucosal tissues are the first immune cells facing the virus [1-3]. T-lymphocytes are the principal HIV target cells during acute infection, but antigen presenting cells (APCs) as DCs residing at mucosal sites are also infected with HIV-1 [3-6]. However, the chronology of cell infection in mucosal sites remains unclear: some authors consider DCs to be the first target cells [3-5, 7], whereas others argue that T-cells recruited to the mucosa are responsible for HIV dissemination [2, 8]. The early contribution of macrophages (another type of APCs) to HIV infection was also suggested [9, 10]. Regardless of the nature of the cells initially targeted by HIV, it is now widely accepted that cell-to-cell spread is the initial step of HIV rapid dissemination [11]. LCs, IDCs and macrophages are involved in crosstalk with T-cells and are therefore expected to play a key role in HIV-1 transfer to neighboring T-cells, thereby contributing to the rapid propagation of HIV.

The mechanism of HIV transfer has been explored almost exclusively through the use of monocyte-derived DCs (MoDCs), a population of DCs readily generated from blood monocytes. A two-step process of HIV transfer has been described in this population [12]. At early time points, direct transfer of the virus from DCs to T-lymphocytes occurs in *trans*, without productive infection of DCs. Subsequently, following *de novo* synthesis of viral particles, a transfer of HIV in *cis* to neighboring permissive target cells has been observed. This two-step transfer process may involve the formation of virological synapses [13, 14], the binding of HIV particles to alternative receptors [15] (such as DC-SIGN [16-18]), or the formation of exosomes [19, 20].

In mucosal tissues, the specific characteristics of resident LCs, IDCs and macrophages may influence the mechanism by which viral particles are transferred to neighboring cells. These cells express specific markers and, by contrast to MoDCs, do not express DC-SIGN. The mechanism of HIV transfer from these APCs has been poorly studied. For the particular case of LCs, the role of langerin in HIV infection and transfer remains a matter of debate [7, 21, 22]. HIV transfer from macrophages to T-cells has been studied mostly following the budding of newly produced viruses (or pseudoviruses) by infected macrophages, corresponding essentially to transfer in *cis* [Groot, 2008 #29].

In this study, the respective contributions of LCs/IDCs and macrophages to HIV transfer to T-lymphocytes were assessed at early time points. These APCs transferred HIV to T-cells efficiently, but at different rates and through distinct mechanisms: MDMs transferred HIV rapidly in *trans* to T-lymphocytes, whereas LCs/IDCs preferentially transferred HIV in *cis*. Transfer by both the *trans* and *cis* mechanisms was inhibited by neutralizing antibody 2G12, although the inhibition of HIV transfer was most effective in MDMs cocultures.

Methods

Antibodies, inhibitors and cytokines

Mouse monoclonal antibodies (Abs) used for cell staining: CD3-VioBlue (5BW264/56), and CD83-APC (HB15) were purchased from Miltenyi Biotec SAS (France); HIV-1 antigen p24 KC57-FITC (FH190-1) and CD207-PE (DCGM04) were obtained from Beckman-Coulter (Roissy, France); CD11b/MAC-1-APC-Cy7 (ICRF44), CD3-PE (UCHT1) were obtained from BD Bioscience and CD64-R-PC5 (10.1) from AbD Serotec.

Viability staining: The “Live/Dead” Fixable Dead Cell Stain Fluorescence kit was purchased from Invitrogen Life Science (Applied Biosystems Inc. California, USA).

HIV-1-specific Abs: Human anti-HIV-1 IgG₁ 2G12 was obtained from Polymun Scientific GmbH (Vienna, Austria).

HIV-1-specific inhibitors: HIV-1 fusion inhibitor Fuzeon (T20) (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) was used at a final concentration of 10 µg/ml. Azidothymidine (AZT), was used at a concentration of 5 µM. Indinavir (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) was used at a final concentration of 1 µM.

Cytokines: All cytokines used for cell culture and differentiation were purchased from Miltenyi Biotec SAS (France), with the exception of GM-CSF, obtained from R&D Systems.

Ethics statement

Umbilical cord blood was obtained from healthy full-term newborns with written parental informed consent according to the guidelines of the medical and ethical

committees of Hôpitaux Universitaires de Strasbourg and Université de Strasbourg, France, and in full compliance with French law.

Human peripheral blood samples were collected from anonymous HIV-1- and HCV-seronegative donors (Etablissement Français du Sang (EFS), Strasbourg) according to the guidelines of the medical and ethical committees of EFS and Université de Strasbourg, France.

Cell preparation

Langerhans cells (LCs) and interstitial dendritic cells (IDCs) were derived from purified CD34⁺ hematopoietic progenitor stem cells obtained with immunomagnetic bead kits for the isolation of human CD34⁺ cells (AutoMacs; Miltenyi Biotec), after Ficoll-Hypaque sedimentation. Purified CD34⁺ cells were cultured in RPMI containing 10% FCS and supplemented with 50 ng/ml Flt3-L, 50 ng/ml GM-CSF, 25 ng/ml SCF and 10 ng/ml TPO at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO₂, for seven days to allow cell multiplication. CD34⁺ cells were then stimulated to differentiate into LCs/IDCs by incubation for another five days in RPMI containing 10% FCS, supplemented with 50 ng/ml GM-CSF, 6 ng/ml TGF-β₁ and 2 ng/ml TNF-α.

Autologous CD4⁺ T lymphocytes were purified by CD4 positive selection on the CD34⁺ population (AutoMacs; Miltenyi Biotec). Cells were then activated by incubation with phytohemagglutinin-A (PHA) (10 µg/million cells) for 3 days, before freezing in liquid nitrogen. Cells were thawed one day before use.

Monocyte-derived macrophages (MDMs) were obtained by differentiation from blood monocytes. Briefly, monocytes and PBLs were obtained by centrifugal elutriation after Ficoll-Hypaque sedimentation. 3.75 x 10⁵ monocytes per well were seeded in 48-well plates and differentiation into macrophages was induced by incubation in AIM medium supplemented with Glutamax (1 X) in the presence of GM-CSF (1 ng/ml) for 5 to 7 days. Autologous PBLs were activated by incubation with PHA (10 µg/million cells) for 3 days and were then frozen in liquid nitrogen until use.

Virus preparation

Primary isolates of HIV-1 were amplified on human blood leukocytes, as previously described [25]. Virus stocks were collected at peak virus production and were concentrated

by a factor of 70 with a 100-kDa cutoff polyethersulfone filter (Centricon 70 Plus Biomax Filter, Millipore, France). HIV-1_{BaL} isolates (subtype B, R5 strain) were provided by S. Gartner, M. Popovic and R. Gallo from the NIH. HIV-1_{TV1} (subtype C, R5 strain) was obtained from S. Engelbrecht from NHLS, University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa.

HIV transfer experiments with LCs/IDCs and autologous CD4 T cells

LCs/IDCs were infected and cocultured with CD4⁺ T lymphocytes in conditions similar to those previously described for HIV-1 transfer experiments [26-28]. Briefly, immature LCs/IDCs were incubated with HIV-1_{BaL} or HIV-1_{TV1} at a concentration of 500 ng/ml viral p24 antigen for two hours. Cells were then thoroughly washed to remove unbound viral particles, and resuspended at a density of 8×10^6 cells/ml in RPMI containing 10% FCS. We added 25 μ l of HIV-1-loaded LCs/IDCs suspension to 25 μ l of a suspension of autologous stimulated T cells at a density of 16×10^6 cell/ml (corresponding to a DC/T cell ratio of 1:2). When indicated, NAb 2G12, AZT (5 μ M), indinavir (1 μ M) or T20 (10 μ g/mL) were added to the coculture at the same time as T cells. Cultures were carried out in a final volume of 100 μ l/well. As a control, HIV-1-exposed LCs/IDCs and infected lymphocytes were cultured alone in similar conditions. The phenotype and productive infection of each cell population in the coculture was assessed by flow cytometry after 72 hours of culture.

HIV transfer experiments with MDMs and autologous PBL

As MDMs are adherent cells, we therefore adapted the transfer experiment protocol accordingly. MDMs (cultured in a 48-well plate, 0.375×10^6 /well) were incubated with 150 μ l of diluted HIV-1_{BaL} primary R5 isolate (corresponding to approximately 200 ng/ml viral p24 antigen) per well for 2 hours. Cells were extensively washed and 50 μ l of a suspension of autologous stimulated PBLs was added (7×10^6 T cell/ml, corresponding to an MDM/T cell ratio of 1:1). When indicated, NAb 2G12, AZT (5 μ M), indinavir (1 μ M) or T20 (10 μ g/mL) were added to the coculture at the same time as T cells. Cultures were carried out in a final volume of 150 μ l/well. The productive infection of each cell population in the coculture was assessed by flow cytometry after 48 hours.

Cell staining and flow cytometry assay

Briefly, cells were labeled by incubation with the "Live/Dead" kit for 10 minutes at room temperature. Cells were then stained for 10 minutes at 4°C with Abs directed against CD11b, CD83 and CD3 for LC/IDC cocultures, or CD64 and CD3 for MDM cocultures. Next, cells were fixed and permeabilized using Cytofix and Perm/Wash kit solutions (BD Biosciences). Finally, MDM cocultures were stained for intracellular p24 antigen and DC cocultures were stained for CD207 and p24. The percentage of cells infected in each cell population was analyzed by flow cytometry. Multicolor acquisition was performed with LSRII SORP cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA) as previously described [21, 29, 30]. Final analysis and graphical output were carried out with FACS Diva software (BD).

Statistical analysis

Groups were compared using GraphPad Prism 5.04 software (GraphPad, San Diego, California, USA) using a two-tailed unpaired *t*-test in fig. 3 and a matched paired Wilcoxon *t*-test in fig. 4. Values of **p*<0.01 and ***p*<0.001 were considered to be statistically significant.

Results

Efficient HIV transfer from APCs to T-lymphocytes

We investigated the contribution of APCs residing in the mucosa to HIV transfer to T-lymphocytes, by generating different types of HIV target cells: (1) primary Langerhans and interstitial DCs (LCs/IDCs) [21, 29], (2) monocyte-derived macrophages and (3) autologous PHA-activated T-lymphocytes. These cells have phenotypes closely resembling those of the different APCs and memory T-cells residing in mucosal and submucosal tissues [31, 32]. We analyzed the early transfer of HIV, by investigating transfer to T-cells after 2 hours of APC incubation with HIV-1 [12]. At various time points, we assessed by flow cytometry the phenotype and the productive infection (intracellular viral protein p24) of the different cell populations (Fig 1a and b).

Kinetic studies of HIV transfer showed that the productive infection of CD3⁺ T-cells in MDM cocultures was sporadic on day 1 (data not shown), but was systematically detected on day 2 (Fig. 1b and 1c). In DC cocultures, the percentage of infected CD3⁺ T-cells was only just above the detection threshold on days 1 and 2 (data not shown), despite the use of similarly high viral inoculate. After three days of DC/T-cell coculture, 2.5% of the CD3⁺ T-cells

were p24⁺ (Fig. 1a and 1c). Experiments performed on cells isolated from several donors showed that HIV transfer to T-cells was repeatedly observed two and three days post infection in MDMs and LC/IDC cocultures, respectively (Fig. 1c). The differences in the rate of HIV transfer observed with MDMs and LCs/IDCs suggest that these different types of APCs transfer HIV to T-cells through distinct mechanisms.

HIV trans-infection of T-cells in cocultures

Next we investigated the relative contributions of HIV *trans* and *cis* infection from APCs to T-lymphocytes. To limit analysis to *trans*, we blocked the production of *de novo* viral particles by adding an HIV-1 protease inhibitor, indinavir. The proportion of T-cells infected by transfer in *trans* was determined (Fig. 2a). In these conditions, about 20% of the T-cells were infected through *trans*-infection in LCs/IDCs cocultures, whereas with MDMs, half of the T-cells were infected in *trans*. Thus, macrophages rapidly and efficiently transfer HIV particles to T-cells in *trans*, while LCs/IDCs transfer HIV principally in *cis*.

Moreover, in presence of indinavir, the percentages of MDMs and LCs/IDCs displaying HIV replication were similar to those observed in the absence of protease inhibitor on days 2 and 3, respectively, indicating that a single cycle of infection had occurred in APCs at these time points (Fig. 2b). These results emphasize the differences in HIV replication and transfer kinetics between MDMs and DC subsets.

Early HIV fusion events and HIV replication in APCs

The efficient *trans* infection of T-cells in MDM cocultures suggested that HIV particles were rapidly transferred to T-cells before fusion with MDMs. We thus analyzed the percentage of HIV that fused to APCs during the two hours of incubation and before the addition of lymphocytes by treatment with the fusion inhibitor T20 (Fig. 3a). In coculture conditions, more than half the total number of HIV particles bound to MDMs had already fused with the cells, whereas in the same conditions, less than 30% had fused with LCs/IDCs. HIV fusion capacity was also analyzed in APCs in the absence of T-cells. The percentage of the virus particles fused to APCs was 44% of control values for LCs, 51% for IDCs, and 76% for MDMs (Fig. 3b). These results show that the fusion capacity of HIV is higher with MDMs than with LCs/IDCs. Interestingly, the capacity of HIV to fuse with APCs was generally lower in the

presence of T-cells, suggesting that in coculture conditions, APCs are more susceptible to infection.

As coculture decreased the fusion capacity of HIV to APCs, we determined the percentage of infection of LCs/IDCs or MDMs in both the presence and absence of T-lymphocytes (Fig. 4). We found that the percentage of infected LCs and IDCs in the presence of T-cells was higher than in the absence of T-cells (Fig. 4a). Conversely, the addition of T-cells to MDM cultures decreased the percentage of infected macrophages (Fig. 4b). Similar results were obtained with HIV-1_{T_{VI}} strains (Fig. 4c and 4d). Thus, coculture with T-cells triggered changes in the fusion and replication of HIV in APC cocultures with T-cells: 1) lower levels of fusion and higher levels of HIV replication in LCs/IDCs, and 2) lower levels of both fusion and HIV replication in MDMs.

Antibody-mediated inhibition of HIV-1 transfer from APCs to T lymphocytes

As the neutralizing Ab (NAb) 2G12 strongly inhibit infection of LCs/IDCs and MDMs [21, 33], we investigated its ability to inhibit *trans* and *cis* infection.

We assessed the effect of various concentrations of NAb 2G12 on the inhibition of HIV transfer to T-lymphocytes. NAb 2G12 efficiently inhibited HIV transfer to T-cell infection in both types of cocultures (Fig. 5a). Surprisingly, the inhibition of HIV transfer to lymphocytes was one thousand fold more effective in cocultures with MDMs than with LCs/IDCs. Indeed, NAb 2G12 inhibited the transfer of HIV from MDMs to T-cells with an IC₈₀ (inhibitory concentration of Ab reducing infection by 80%) of 0.03 µg/ml, whereas the IC₈₀ was 40 µg/ml for T-cells cocultured with LCs/IDCs (Fig. 5a). As *trans* infection accounted for 50% of all T-cell infections in MDM cocultures, we therefore analyzed the inhibitory activity of this NAb in MDM cocultures in the presence of indinavir (Fig. 5b). In these conditions, the IC₈₀ of 2G12 for inhibiting HIV *trans* infection from MDMs to T-cells was 5 µg/ml, indicating that 2G12 inhibited direct transfer in *trans*. In LC/IDC cocultures, the percentage of transfer occurring in *trans* was low (20% of all T-cell infections, corresponding to less than 0.5% of the infected cells), and it was therefore not possible to assess the inhibitory activity of NAb in these conditions. Overall, these results demonstrate that 2G12 NAb effectively inhibits the transfer of HIV from APCs to T-cells.

We then analyzed the ability of 2G12 to inhibit APC infection in coculture conditions. Slightly lower levels of infection of HIV-loaded APCs were observed in the presence of 2G12

(Fig. 5c). About 30% and 45% of DCs and MDMs, respectively, remain infected in the presence of 2G12. These percentages of infected APCs correspond to the percentages of APCs already infected during the 2 hours of incubation with HIV (as shown in Fig. 3). Therefore, as a decreased viral replication was observed, 2G12 likely inhibits the replication of HIV particles that have not yet fused to APCs after the two-hour incubation step.

Discussion

In addition to infection by free virus particles, cell-to-cell transfer of HIV has been identified as a crucial mode of HIV-1 dissemination in the body. The transfer between MoDCs and T-cells has been widely studied, but specific cell-to-cell transfer from APCs present at the mucosal site, such as LCs, IDCs and macrophages, has been poorly investigated.

In this study, we demonstrated that HIV-1 is efficiently transferred from LCs/IDCs and MDMs to autologous activated T-lymphocytes. However, the speed of transfer differed between DCs and MDMs: T-cell infection was detectable after two days of incubation with HIV-loaded MDMs, whereas three days were necessary to detect infection in LC/IDC cocultures. This rapid transfer from MDMs to lymphocytes was associated with a high percentage of transfer in *trans*. Moreover, the fusion capacity of viral particles was also found to be higher with MDMs than with LCs/IDCs. This efficient fusion of HIV with MDMs involved rapid viral entry into the cell *via* receptor and co-receptor binding, decreasing the percentage of virus particles remaining bound to the surface of the cells. However, the mechanism by which MDMs transfer HIV efficiently in *trans* remains unclear. It has been suggested that virus particles attached to alternative receptors on APCs may be efficiently transferred to T-lymphocytes in *trans* [1, 14, 23, 34, 35]. However, most detailed analyses of the mechanisms underlying transfer have been performed on MoDCs, which display high levels of DC-SIGN expression on their surface. This lectin, which has been reported to participate in efficient HIV transfer between DCs and T-cells [17, 18, 36], is poorly expressed on LCs, IDCs and MDMs. Other alternative receptors, such as the mannose receptor, which is strongly expressed by macrophages, may therefore play a role in the binding and transmission of HIV [34]. Interestingly, in our study, the efficient transfer of the virus in *trans* from MDMs to T-cells was associated with an efficient fusion and replication in these APCs,

raising questions about the potential role of the binding of HIV particles to cell surface receptors in this type of transfer.

Even more puzzling, the kinetics of viral fusion and replication were modified in the context of APC/T cell cocultures. In the presence of lymphocytes, lower levels of HIV replication were observed in MDMs, suggesting a redirection of the virus to the principal HIV target, the T-cells. In addition, contact between MDMs and T-cells may have induced the production of antiviral cytokines [37], thereby limiting HIV replication in these cells. Conversely, the presence of T-cells in LC/IDC cocultures resulted in higher rates of HIV replication in DCs. This phenomenon was not HIV strain-dependent (Fig. 4) and has already been described for MoDC/T-cell cocultures [29, 30]. The precise mechanism underlying this increase in HIV replication is unknown. Furthermore we previously reported that the coculture of MoDCs with T-cells induces a slight maturation of the DCs, independently of viral replication [29, 30], and that these mature DCs remained uninfected. These results suggest that, in our coculture conditions, the state of the DCs may be modified by crosstalk with T-cells. Thereby, it remains to be determined whether expression of various factors (such as restriction factors, cytokines or cellular proteins) by LCs and/or IDCs are modified in our coculture conditions, where immature HIV-loaded DCs are cultured with uninfected primary T-cells.

Finally, we demonstrated that the transfer of HIV from LCs/IDCs and MDMs to T-cells was inhibited by the NAb 2G12. The effects of 2G12 were particularly potent in MDMs/T-cells cocultures. The inhibition of HIV transfer to T-cells was one thousand fold more effective in cocultures with MDMs than with LCs/IDCs. As *trans* infection accounted for more than 50% of all viral transfer from MDMs to T-cells, this higher inhibition may be related to the inhibition of a mechanism or component involved in *trans* infection. MDMs have been reported to store newly produced HIV particles in intracellular compartments still connected to the external environment [38-40]. Similar compartments may harbor both HIV particles and NAbs, facilitating the efficient neutralization of HIV particles before their transfer to neighboring cells. Furthermore, the binding of NAb to the high-affinity Fc γ receptors strongly expressed on MDMs may locally increase its concentration, that might enhance the potential of the NAb to inhibit HIV transfer in these cells [33]. Further investigations of the mechanism by which HIV transfer is inhibited should facilitate definition of the characteristics of Abs associated with the potent inhibition of early transfer in *trans*.

Altogether, our study demonstrates that macrophages transfer HIV viral particles very efficiently to T-cells in *trans* while LC/IDC favors *cis*-infection of lymphocytes. These results are consistent with a possible two-step propagation mechanism leading to the efficient dissemination of HIV after mucosal transmission. Following T-lymphocyte recruitment to the site of infection, MDMs transmit viral particles effectively in *trans*, leading to the direct infection of neighboring HIV target cells at the mucosal site. Subsequently, LCs/IDCs, mostly mediating viral transfer in *cis* following *de novo* production of viral particles, may promote HIV dissemination at later time points and to distal sites, following their migration to the lymph nodes.

Acknowledgments

We particularly wish to thank Mrs. D. Mirisky, S. Marteau and M.P. Henry (Prof. I. Nisand, Service of Gynecology and Maternity, CHU Strasbourg-Hautepierre) for supplying healthy cord blood samples and Alexandre Lederle for its assistance with aspects of this research. This project was supported by funds from EuroNeut 41 (FP7-HEALTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Sidaction, Fondation Dormeur, fonds de dotation Pierre Bergé and ANRS grants. M.P was supported by EuroNeut41 grants.

Authors' Contributions

M.P, A.P. and S.S. performed the experiments; M.P., A.P., V.H and C.M. analyzed the data; M.P., S.S., B.S., A.P., V.H., M.L., M.E.B., G.L., T.D., and C.M. provided reagents/materials/analysis/tools; M.P. and C.M. conceived and designed the experiments and wrote the paper.

Disclosure of conflicts of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Piguet V, Steinman RM. **The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways.** *Trends Immunol* 2007,28:503-510.
2. Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, Patterson BK. **Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system.** *J Virol* 2002,76:9868-9876.
3. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, McElrath MJ. **Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1.** *Immunity* 2007,26:257-270.
4. Spira AI, Marx PA, Patterson BK, Mahoney J, Koup RA, Wolinsky SM, Ho DD. **Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques.** *J Exp Med* 1996,183:215-225.
5. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. **Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells.** *J Virol* 2000,74:6087-6095.
6. Miller CJ, Shattock RJ. **Target cells in vaginal HIV transmission.** *Microbes Infect* 2003,5:59-67.
7. Kawamura T, Koyanagi Y, Nakamura Y, Ogawa Y, Yamashita A, Iwamoto T, *et al.* **Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV.** *J Immunol* 2008,180:3297-3304.
8. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, *et al.* **Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells.** *Science* 1999,286:1353-1357.
9. Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, Huff K, Bimczok D, *et al.* **Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Virol* 2009,83:3258-3267.
10. Shen R, Richter HE, Smith PD. **Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa.** *Am J Reprod Immunol* 2011,65:261-267.
11. Haase AT. **Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission.** *Nature* 2010,464:217-223.
12. Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, *et al.* **Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells.** *Blood* 2004,103:2170-2179.
13. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. **Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions.** *Science* 2003,300:1295-1297.
14. Piguet V, Sattentau Q. **Dangerous liaisons at the virological synapse.** *J Clin Invest* 2004,114:605-610.
15. Wu L, KewalRamani VN. **Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination.** *Nat Rev Immunol* 2006,6:859-868.
16. Boggiano C, Manel N, Littman DR. **Dendritic cell-mediated trans-enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is independent of DC-SIGN.** *J Virol* 2007,81:2519-2523.
17. Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. **DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2003,276:31-54.

18. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. **DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection.** *Immunity* 2002,16:135-144.
19. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, *et al.* **Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway.** *Blood* 2009,113:2732-2741.
20. Wiley RD, Gummuluru S. **Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,103:738-743.
21. Peressin M, Holl V, Schmidt S, Decoville T, Mirisky D, Lederle A, *et al.* **HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies.** *J Virol* 2011,85:1077-1085.
22. de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, *et al.* **Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells.** *Nat Med* 2007,13:367-371.
23. Groot F, Welsch S, Sattentau QJ. **Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses.** *Blood* 2008,111:4660-4663.
24. Gousset K, Ablan SD, Coren LV, Ono A, Soheilian F, Nagashima K, *et al.* **Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages.** *PLoS Pathog* 2008,4:e1000015.
25. Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, Aubertin AM, Moog C. **Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells.** *J Virol* 2006,80:6177-6181.
26. Cavrois M, Neidleman J, Kreisberg JF, Greene WC. **In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions.** *PLoS Pathog* 2007,3:e4.
27. Yu HJ, Reuter MA, McDonald D. **HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells.** *PLoS Pathog* 2008,4:e1000134.
28. Gummuluru S, KewalRamani VN, Emerman M. **Dendritic cell-mediated viral transfer to T cells is required for human immunodeficiency virus type 1 persistence in the face of rapid cell turnover.** *J Virol* 2002,76:10692-10701.
29. Holl V, Xu K, Peressin M, Lederle A, Biedma ME, Delaporte M, *et al.* **Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes.** *J Virol* 2010,84:4172-4182.
30. Su B, Xu K, Lederle A, Peressin M, Biedma ME, Laumond G, *et al.* **Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes.** *Blood* 2012,120:3708-3717.
31. Hirbod T, Kaldensjo T, Lopalco L, Klareskog E, Andersson S, Uberti-Foppa C, *et al.* **Abundant and superficial expression of C-type lectin receptors in ectocervix of women at risk of HIV infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009,51:239-247.
32. Valladeau J, Saeland S. **Cutaneous dendritic cells.** *Semin Immunol* 2005,17:273-283.
33. Holl V, Hemmerter S, Burrer R, Schmidt S, Bohbot A, Aubertin AM, Moog C. **Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages.** *J Immunol* 2004,173:6274-6283.
34. Nguyen DG, Hildreth JE. **Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages.** *Eur J Immunol* 2003,33:483-493.

35. Martin N, Sattentau Q. **Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion.** *Curr Opin HIV AIDS* 2009,4:143-149.
36. Turville S, Wilkinson J, Cameron P, Dable J, Cunningham AL. **The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis.** *J Leukoc Biol* 2003,74:710-718.
37. Herbein G, Gras G, Khan KA, Abbas W. **Macrophage signaling in HIV-1 infection.** *Retrovirology* 2010,7:34.
38. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M. **Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages.** *J Cell Biol* 2003,162:443-455.
39. Welsch S, Groot F, Krausslich HG, Keppler OT, Sattentau QJ. **Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages.** *J Virol* 2011,85:7922-7927.
40. Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, Krausslich HG. **HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages.** *PLoS Pathog* 2007,3:e36.

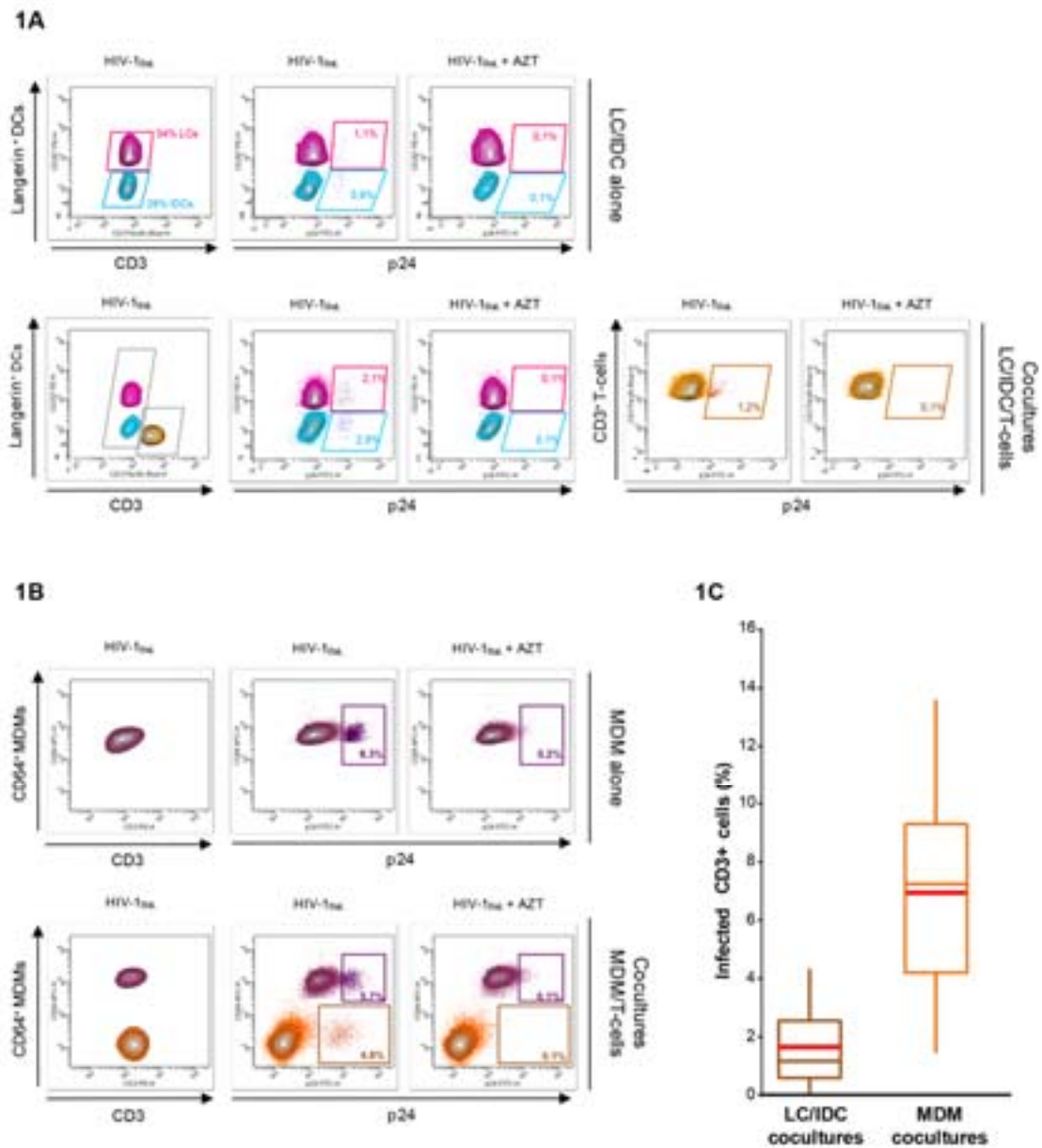


Fig. 1. Transfer of HIV-1_{BaL} from LCs/IDCs or MDMs to autologous T-cells. (a) LCs, IDCs and CD4 T-cells are distinguished by their expression of langerin (CD207), CD11b and CD3, respectively. Expression of HIV-1 protein p24 in each cell population was analyzed in the presence or the absence of AZT (10^{-5} M) after 3 days of culture. **(b)** MDMs and PBLs are distinguished by their expression of CD64 and CD3, respectively. Expression of p24 in each cell population was analyzed in the presence or the absence of AZT (10^{-5} M) after 2 days of culture. **(c)** Box plots represent the percentage of p24 positive T-cells in the cocultures with LCs/IDCs (n=17) or MDMs (n=15) after 3 or 2 days, respectively.

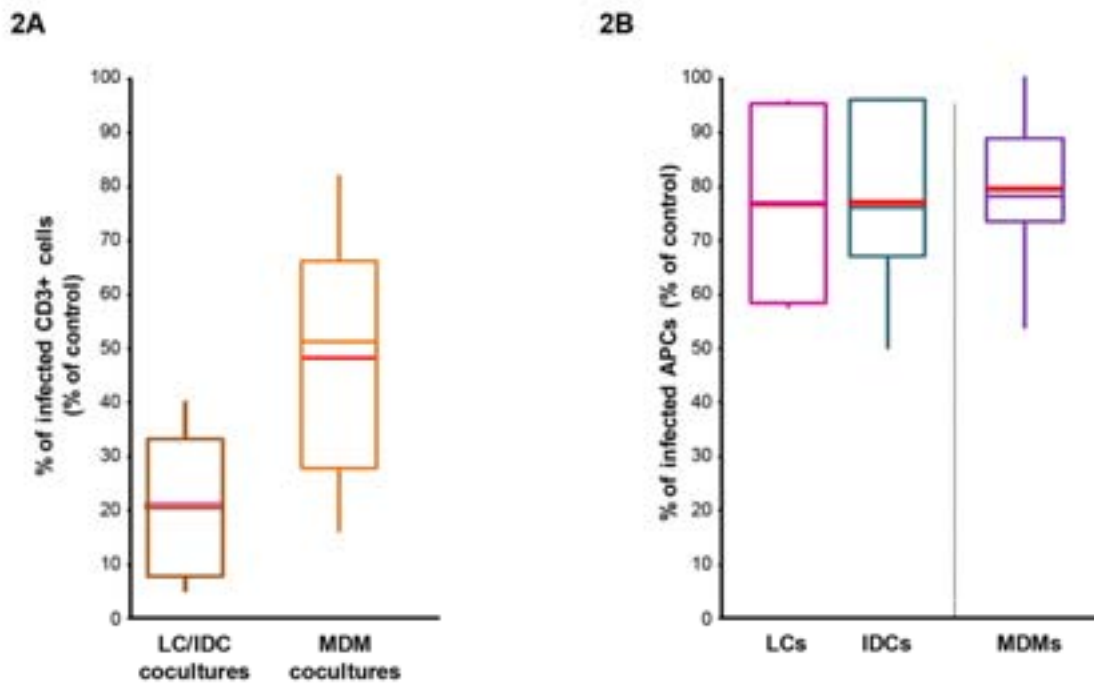


Fig. 2. Transfer in *trans* from APCs to T-lymphocytes. (a) Box plots represent the percentage of p24-positive T-cells in cocultures with LCs/IDCs (n=7) or MDMs (n=10) resulting from *trans*-infection. Protease inhibitor indinavir (1 μ M) was added at the same time as T-cells in the cocultures, and the percentage of infection in the presence of indinavir was compared to the percentage of infection in the absence of drug. (b) Single cycle of replication in APCs in coculture conditions. Box plot representation of the percentage (compared to control without drug) of infected LCs and IDCs (n=5), and MDMs (n=7) in coculture conditions in the presence of the protease inhibitor indinavir (1 μ M).

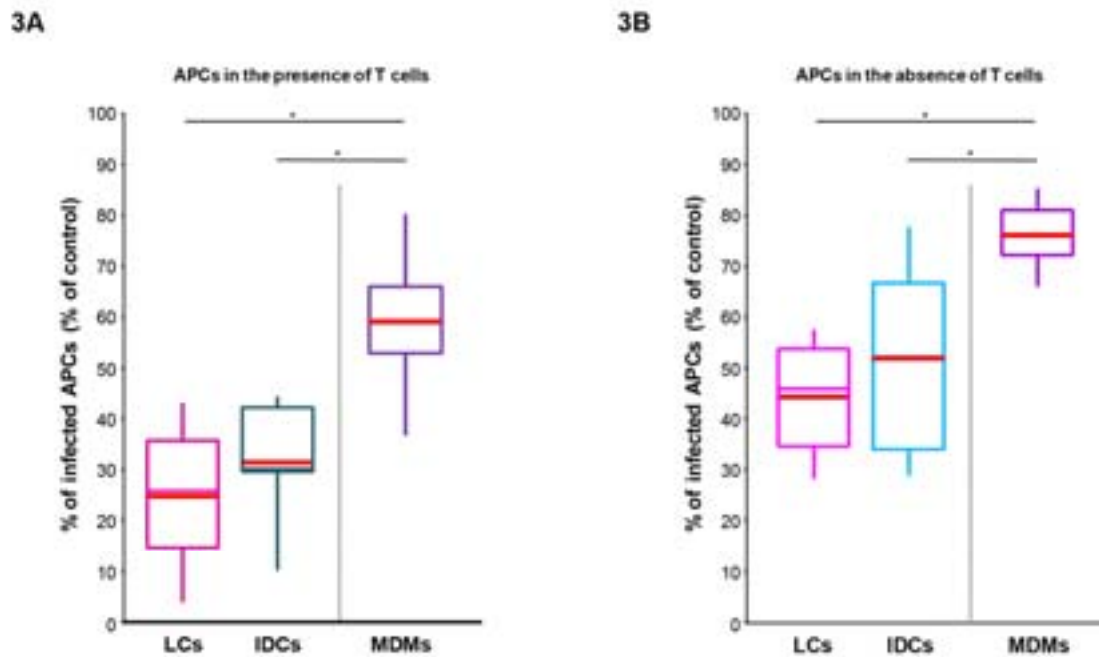


Fig.3. HIV-1_{BaL} fusion with APCs in presence or absence of T cells in the culture. Box plot representation of the percentage of infected APCs (compared to control without drug) in the presence of fusion inhibitor T20 (5 µg/mL) (n=5), **(a)** in the presence of T-cells in the cocultures and **(b)** in the absence of T-cells in the cocultures. T20 was added after the 2 hours of incubation of HIV-1_{BaL} /APCs, at the same time as T-cells. Statistical comparison were performed using an unpaired t-test (*p<0.05).

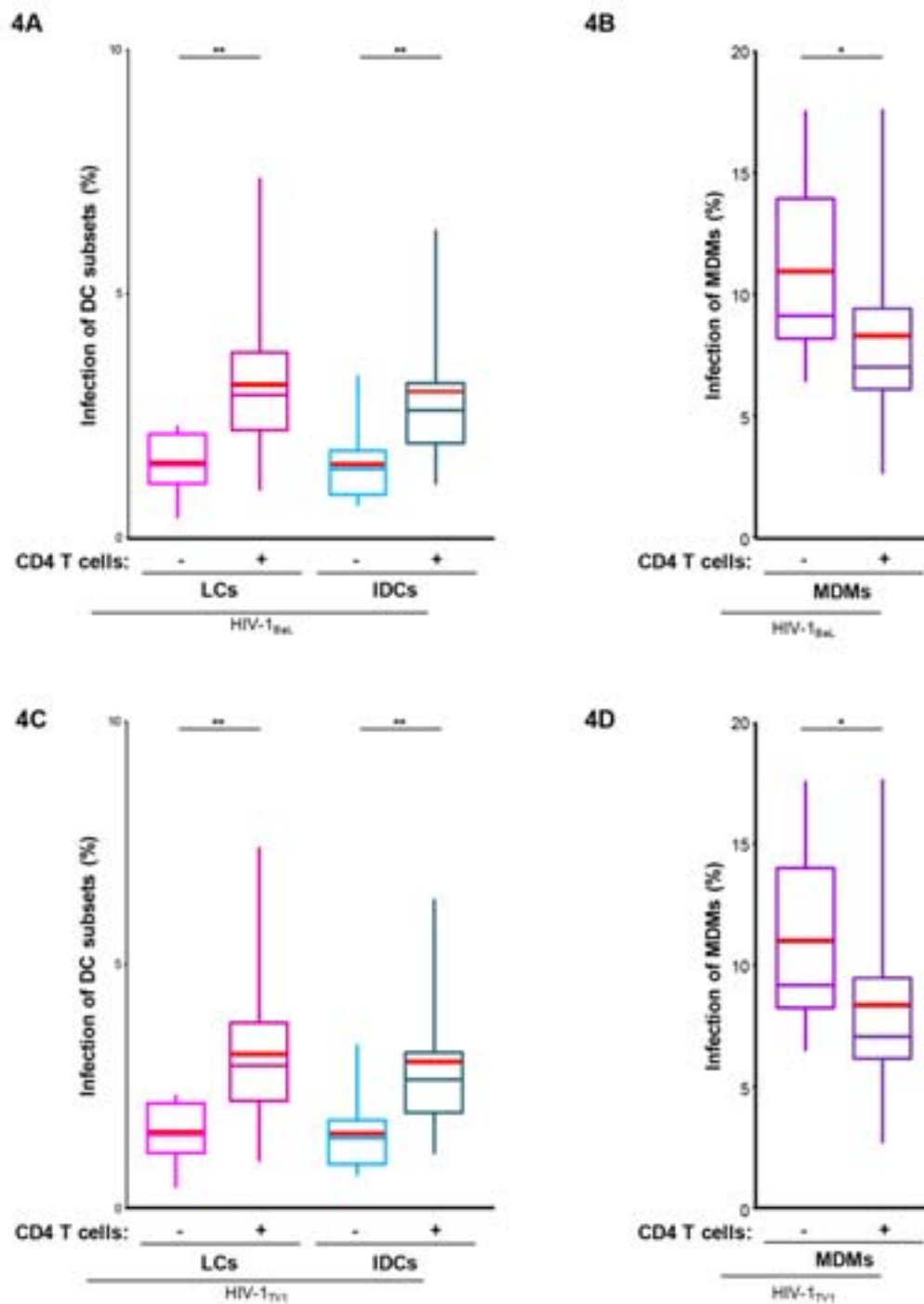


Fig.4. HIV-1 replication kinetic in APCs is modified by the presence of T-cells in the cocultures. LCs/IDCs or MDMs were incubated 2 hours with HIV-1_{BaL} (a and b) or HIV-1_{TRV1} (c and d), prior to culture with or without uninfected autologous T-cells. Box plots represent the percentage of infected LCs and IDCs (a and c) or MDMs (b and d) (n≥11 and n≥6 for HIV-1_{BaL} and HIV-1_{TRV1} experiments, respectively). Statistical comparison were performed using a matched paired Wilcoxon t-test (*p<0.01, **p<0.001).

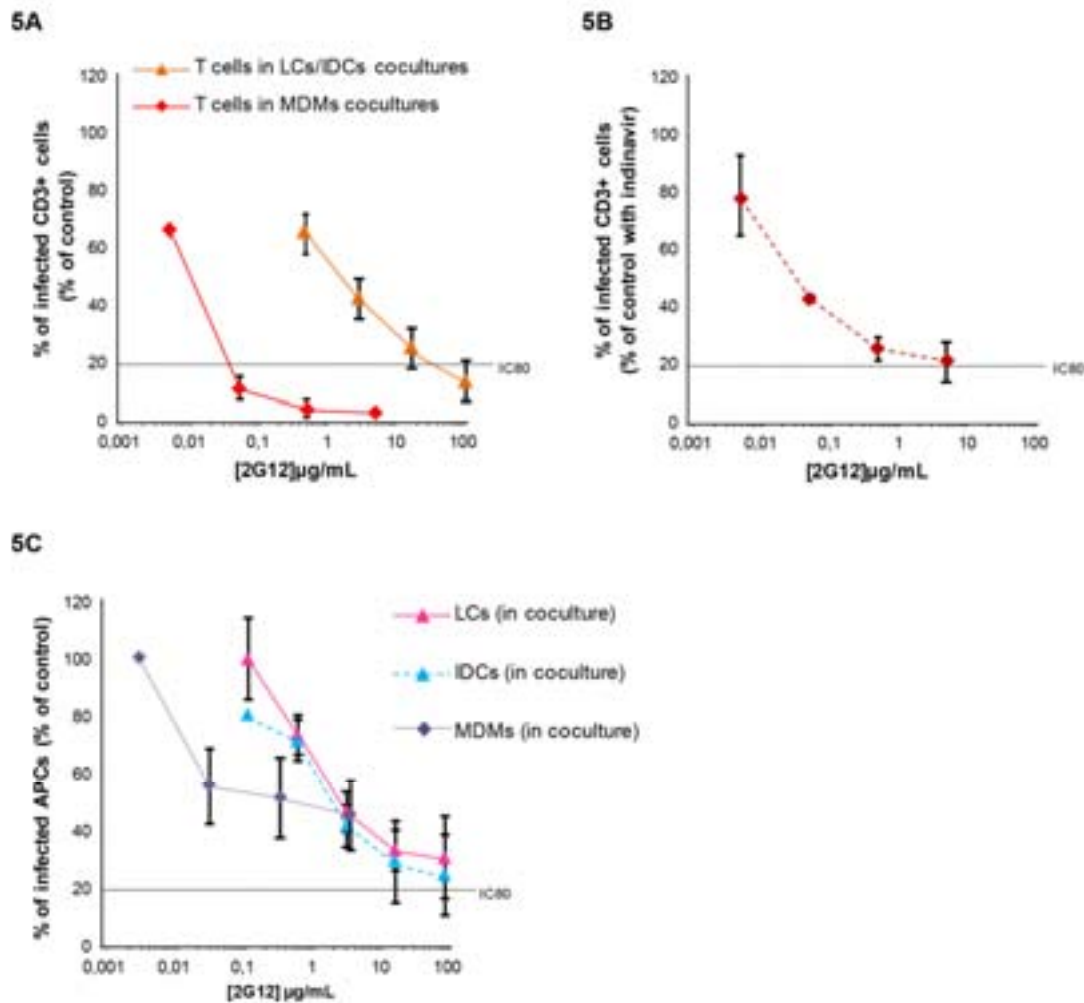


Fig.5. Inhibition of HIV-1_{BaL} transfer by neutralizing antibody 2G12. Different concentrations of 2G12 were added in the cocultures at the same time as T cells. Percentage of infection was determined in each cell population in the 2 types of cocultures after 2 or 3 days, for MDMs or LCs/IDCs cocultures, respectively. **(a)** Inhibition of HIV-1_{BaL} transfer by NAb 2G12 in the different types of cocultures; **(b)** Inhibition of HIV-1_{BaL} *trans*-infection by 2G12 in MDMs cocultures in the presence of protease inhibitor indinavir (1 μM , added at the same time as T cells and 2G12 in the cocultures); **(c)** Inhibitory activities of 2G12 on APCs infection in coculture conditions. Data are representative of three independent experiments performed with three different donors, and performed in duplicates. Results are shown as mean +/- s.e.m.

MANUSCRIT 2

Les anticorps neutralisants anti-gp120 inhibent plus efficacement le transfert du VIH-1 des macrophages aux lymphocytes que l'infection par le virus libre

Anti-gp120 neutralizing antibodies better inhibit HIV-1 transfer from macrophages to lymphocytes than infection by free viral particles

Alizé Proust, Sylvie Schmidt, Bin Su, Maryse Peressin, Mélanie Lambotin, Marina E. Biedma, Thomas Decoville, Géraldine Laumond, Vincent Holl et Christiane Moog

Publication en préparation

Des études récentes (Manuscrit 1; Groot et al., 2008) démontrent que les macrophages transfèrent efficacement le VIH-1 aux lymphocytes T. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans ce transfert et nous avons analysé les capacités d'inhibition des anticorps sur ce transfert.

Dans des conditions de transfert où 50% des particules virales sont transférées en *trans* et 50% sont transférées en *cis*, nous démontrons que les anticorps neutralisants (AcN) dirigés contre les épitopes de la gp120 et la gp41 du VIH-1 inhibent efficacement le transfert du virus des MDMs aux PBLs. Au contraire, les anticorps non-neutralisants inhibiteurs (AcNNI) n'ont pas d'activité inhibitrice sur ce transfert. Par contre, les AcN et certains AcNNI inhibent la réplication virale dans les MDMs bien qu'ils soient ajoutés deux heures après l'incubation des MDMs avec le virus. L'inhibition du transfert du VIH-1 des MDMs aux PBLs par les anticorps a été comparée à l'inhibition de l'infection des PBLs par le virus libre. Nous observons que l'efficacité des AcN sur le transfert du VIH-1 des MDMs aux PBLs est dépendante de l'épitope viral reconnu et la souche virale utilisée. Ainsi, les anticorps dirigés contre la gp120 sont particulièrement efficaces dans l'inhibition du transfert du VIH-1_{BaL}.

Ces résultats suggèrent que l'induction d'AcN *in vivo* au niveau des muqueuses permettrait d'inhiber le transfert du VIH-1 de cellule-à-cellule, limitant de ce fait la dissémination du virus dans l'organisme.

Anti-gp120 neutralizing antibodies better inhibit HIV-1 transfer from macrophages to lymphocytes than infection by free viral particles.

Alizé Proust¹, Sylvie Schmidt¹, Bin Su¹, Maryse Peressin¹, Mélanie Lambotin¹, Marina E. Biedma¹, Thomas Decoville¹, Géraldine Laumond¹, Vincent Holl² and Christiane Moog^{1*}

¹INSERM UMR_1110, FMTS, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

²COVANCE, Lab Science Department, Hematology and Flow Department, Covance CLS SA, 7 rue Moise-Marcinhes, CH-1217 Meyrin, Geneva, Switzerland.

*** Corresponding author:**

Dr. Christiane Moog

INSERM U1110

Tel. +33 (0)368853742

Fax. +33 (0)368853724

e-mail: c.moog@unistra.fr

Running title: NAbs inhibit HIV-1 transfer from MDMs to PBLs

Keywords: HIV, cell-to-cell transfer, macrophages, lymphocytes, antibodies

Abbreviations used: HIV, human immunodeficiency virus; AZT, azidothymidine; MDMSs, monocyte-derived macrophages; PBLs, peripheral blood lymphocytes; MDCCs, monocytes-derived dendritic cells; NAbs, neutralizing antibodies, NNIAbs, non-neutralizing antibodies

This work was supported by funds from EuroNeut 41 [FP7-HEALTH-2007-A-201038], EuroPrise [LSHP-CT-2006-037611], Fondation Dormeur, Sidaction, Fonds de dotation Pierre Bergé and ANRS. The authors have no conflicting financial interests.

Abstract:

Spread of HIV-1 in sexual mucosa plays a critical role in viral pathogenesis and defining mechanisms of this spread is crucial for the development of strategies against HIV-1 infection. In our study, we analyzed the ability of macrophages (MDMs) to transfer HIV-1 to autologous peripheral blood lymphocytes (PBLs) and the capacity activity of antibodies to inhibit such transfer. We showed that MDMs transferred HIV-1 to PBLs using *trans*- and *cis*-mechanisms which were efficiently inhibited by neutralizing antibodies. On contrary, non-neutralizing antibodies did not prevent transfer. However, neutralizing and non-neutralizing antibodies were able to inhibit HIV-1 replication in MDMs and cells reinfection by newly synthesized virions. Comparison of the efficiency of neutralizing antibodies on the transfer from different antigen presenting cells to T cells demonstrated that neutralizing antibodies inhibitory activity may be dependant of viral strain, donor cell and HIV-1 epitope recognize by the antibody. Taken together, our results demonstrate a major participation of MDMs in the HIV-1 dissemination. We propose that neutralizing antibodies, able to efficiently inhibit HIV-1 transfer from MDMs to PBLs and HIV-1 replication in MDMs, should be one of the components to be induced by vaccination directly at the mucosal to prevent dissemination of the virus after sexual HIV-1 infection.

Introduction:

Currently, HIV-1 is mainly transmitted through heterosexual intercourse (1). Thus, vaccine strategies are focused on the induction of an immune response at mucosal sites to prevent infection of the first target cells and spread of HIV-1 in the body (2).

CD4 T lymphocytes are the main targets of HIV-1. However, during infection by genital tracts, it has been proposed that antigen presenting cells (dendritic cells and macrophages) present in the genital mucosa, the gateway of the virus, are the first targets of the virus (3-5).

Macrophages, present in large numbers in the genital mucosa, are able to replicate HIV-1, spread the virus to the brain and act as a reservoir (6, 7). Moreover, similarly to dendritic cells, they are also involved in HIV-1 capture and transmission to peripheral blood lymphocytes (PBLs). Cell-to-cell transfer is particularly efficient and would facilitate the spread of the virus in the body. However, only few data are available regarding HIV-1 transfer from MDMs to PBLs. A rapid transfer between HIV-1 infected monocytes-derived macrophages (MDMs) and uninfected PBLs requiring direct cellular contact has been shown (8). More recently, two studies have shown that MDMs created a transient virological synapse to transfer HIV-1 to CD4 T lymphocytes *in cis*, allowing an infected MDM to transfer the virus to at least one CD4 T cell every 6 hours (9, 10). However, to date, no studies have investigated the inhibitory efficacy of antibodies on HIV-1 transfer from MDMs to PBLs.

Two mechanisms have been described for HIV-1 transfer from monocytes-derived dendritic cells (MDDCs) to CD4 T lymphocytes (11, 12): *trans*-transfer in which the virus is directly transmitted to CD4 T cells without viral replication in DCs (11, 13) and *cis*-transfer in which the MDDCs are productively infected and the virions newly produced are transmitted to CD4 T lymphocytes (11). Interestingly, it has been proposed that these two modes of transfer may be separated in time: during the first 24 hours after infection of MDDCs, the virus is transferred *in trans* to CD4 T cells, while the transfer would occur *in cis* during the following days (11).

The notion of broad neutralizing antibodies (NAbs) specifically refers to monoclonal antibodies, cloned from infected individuals, with the ability to prevent HIV-1 infection of target cells in the absence of other factors such as Fc receptors or complement. NAbs are able to efficiently inhibit infection of MDDCs, MDMs, Langerhans and interstitial dendritic cells by most HIV-1 isolates and are of particular interest for vaccines development. In addition, non-neutralizing inhibitory antibodies (NNIABs) have no neutralizing activities but are able to inhibit HIV-1 replication *via* Fc receptors (14-16). The inhibitory activity of NAbs on HIV-1

transfer from MDDCs to PBL is controversial. Nevertheless, recent studies suggested that virus transferred between MDDCs and CD4 T cells would be accessible to NAbs (17-19).

In this study, we first examined the mechanisms of HIV-1 transfer from MDMs to PBLs. We also investigated the efficiency of NAbs to inhibit HIV-1 transfer from MDMs to autologous PBLs. We then compare these efficiencies to the ones of the same NAbs on (i) HIV-1 transfer from MDDCs to CD4 T cells and (ii) infection of PBLs by free viral particles. We demonstrated for the first time an efficient HIV-1 transfer from MDMs to PBLs in *trans* and in *cis* involving a rapid fusion of the virus in the macrophages. NAbs directed against HIV-1 gp120 inhibit efficiently this transfer with a higher efficiency than NAbs directed against gp41. NNIAbs have no inhibitory activity on this transfer. Very interestingly, we observed a better efficiency of anti-gp120 NAbs to inhibit HIV-1 transfer from MDMs to PBLs than to block either PBLs infection by free viral particles or HIV-1 transfer from MDDCs to CD4 T cells.

Results:

Efficient HIV-1 *trans*- and *cis*-transfer from MDM to PBLs and replication in MDMs independently of the viral strain

We first studied mechanisms of HIV-1 transfer from MDMs to PBLs by incubating MDMs for 2 hours with R5-primary isolates of HIV-1 (BaL or SF162) before extensive washes to remove unbound virus. MDMs were then cocultured for 40 hours with non-infected autologous PHA-activated PBLs. Productive infection of both cell types was detected by measurement of intracellular p24 in each cell population by flow cytometry, with MDMs and PBLs being discriminated in the coculture according to their specific markers (CD64 and CD3 respectively) (figure S1).

After 40 hours of culture, both MDMs and PBLs were detected positive for intracellular p24 indicating effective infection of both cell types and efficient transfer of HIV-1 from MDMs to PBLs (figure 1A and C). HIV-1_{BaL} strain is macrophage-tropic while HIV-1_{SF162} strain is not, explaining why infection of MDMs was less efficient using HIV-1_{SF162} strain compared to HIV-1_{BaL} strain. Interestingly, using HIV-1_{BaL} strain, the percentage of infected MDMs was significantly decreased in coculture with PBL compared to the infection of MDMs alone (1.6 fold decreased) (figure 1A).

In order to distinguish *trans*- and *cis*- transfer, we added indinavir at the same time as PBLs (coculture time = 0 hours). Indinavir, a protease inhibitor, prevents new cycles of infection by blocking final assembly and maturation of newly synthesized virions. Under these conditions, 3.5% (HIV-1_{BaL}) and 2.9% (HIV-1_{SF162}) of the MDMs in the coculture were positive for intracellular p24 (figure 1A and C) corresponding, respectively, to 72% and 46% of control infected MDMs without indinavir (figures 1B and D). This result indicates that about 70% (HIV-1_{BaL}) and 45% (HIV-1_{SF162}) of the MDMs infection in coculture correspond to a single cycle of replication while the 30% and 35% remaining correspond to a second cycle of replication allowing reinfection of the MDMs. Conversely, about 35% (HIV-1_{BaL} and HIV-1_{SF162}) of the PBLs population was found positive for intracellular p24 in the presence of indinavir (figure 1B and D) indicating that about 35% of the HIV-1 replication detected in these PBLs corresponds to HIV-1 transfer in *trans* and the resting 65% corresponds to HIV-1 transfer in *cis*.

These results indicates that HIV-1 is efficiently transferred in *trans* and in *cis* from MDMs to PBLs, independently of the viral strain.

Neutralizing antibodies inhibit *trans*- and *cis*-transfer from MDMs to PBLs.

We then analyzed the capacity of monoclonal antibodies to inhibit HIV-1 transfer from MDMs to PBLs by adding a panel of specific anti-HIV-1 Abs at serial concentrations at the same time as PBLs (coculture time = 0 hours). The percentage of intracellular p24-infected PBLs was determined after 40 hours of coculture and the concentration of antibody required to inhibit 70% of infection (inhibitory activity 70, IC₇₀) was calculated. The four NAbs directed HIV-1 gp120 tested (2G12, b12, PG9 and VRC01) prevented efficiently HIV-1 transfer from MDMs to PBLs with IC₇₀ values between 0.02 and 3.9 µg/mL (figure 2A and C). Those NAbs had a better inhibitory activity on HIV-1_{BaL} transfer than HIV-1_{SF162} transfer. Of note, NAbs PG9, known to have no neutralizing efficacy on HIV-1_{SF162} viral strain (20), , also exhibit no efficacy on HIV-1_{SF162} transfer inhibition. NAbs directed against HIV-1 gp41 (2F5 and 4E10) inhibit less efficiently HIV-1_{BaL} transfer from MDMs to PBLs and had no significant inhibitory activity on HIV-1_{SF162} viral strain (figure 2A and C). Non-neutralizing antibodies (246-D, 4B3 and 3D6) did not prevent HIV-1 transfer to PBLs. Inhibitory activity of antibodies on HIV-1 transfer from MDMs to PBLs are summarized Table 1.

As MDMs transferred efficiently HIV-1 in *trans* and in *cis* to PBLs, we studied the ability of NAbs to inhibit both transfer mechanisms by adding NAbs and indinavir at the same time as PBLs (coculture time = 0 hours). Indeed, using indinavir, the *cis*-transfer is blocked, allowing us to analyze efficacy of Nabs only on *trans*-transfer. In this condition, we observed an inhibition of PBLs infection implying that NAbs efficiently inhibit HIV-1 *trans*-transfer (figure 2B). The difference between the inhibition in presence or absence of the protease inhibitor, corresponding to the *cis*-transfer, indicates that the *cis*-transfer is also inhibited by Nabs although with a lesser efficiency than *trans*-transfer (figure 2B).

Comparison of antibodies inhibitory activity between HIV-1 transfer to PBLs and infection of PBLs by free virus

We first compared the inhibitory efficacy (IC₇₀) of antibodies on HIV-1 transfer from MDMs to PBL to neutralization of PBL infection by free virus (figure 3). The three anti-gp120 NAbs tested (2G12, b12 and VRC01) had a better inhibitory activity HIV-1_{BaL} transfer than on

neutralization. A similar profil was observed using HIV-1_{SF162}, except for b12 which appears to better inhibit neutralization than transfer. On the contrary, the IC₇₀ of the two anti-gp41 NAbs tested (4E10 and 2F5) were equivalent for neutralization and for HIV-1 transfer from MDMs to PBLs (figure 3).

We then compared the inhibitory efficacy (IC₇₀) of these NAbs on HIV-1_{BaL} transfer from MDMs to PBLs to HIV-1_{BaL} transfer from MDDCs to CD4 T cells (19) (figure S2).. The IC₇₀ of 2F5 and 4E10 were similar for the two types of transfer. On the contrary, the IC₇₀ of b12, VRC01 and 2G12 were respectively 75, 80 and 95 fold lower in transfer from MDMs than from MDDCs indicating that b12, VRC01 and 2G12 antibodies better inhibit HIV-1_{BaL} transfer from MDMs to PBLs than from MDDCs to CD4 T cells.

Taking together, these data demonstrated a better efficiency of anti-gp120 NAbs to inhibit HIV-1 transfer from MDMs to PBLs than PBLs infection by free viral particles and HIV-1 transfer from MDDCs to CD4 T cells. The efficiency of anti-gp41 NAbs was quite similar in the two types of transfer and neutralization.

Neutralizing antibodies efficiently inhibit HIV-1 replication in MDMs even after 2 hours of MDMs incubation with the virus

MDMs are efficiently infected by HIV-1 in transfer conditions. Therefore, in parallel to the impact of antibodies on HIV transfer to PBLs, we analyzed their capacity to inhibit MDMs infection in coculture conditions. As shown on figure 4A and C, antibodies efficiently inhibit MDMs infection. However, this inhibition is only partial, suggesting that after 2 hours incubation with the virus, i.e at the time of antibodies addition, part of viral particles have already enter into MDMs, and are therefore not accessible anymore to antibodies.

To confirm this hypothesis, we studied the fusion step of HIV-1 in transfer conditions. For that purpose T20, a fusion inhibitor, was added at the same time as PBLs (coculture time = 0 hours). In these conditions, more than 40 % (HIV-1_{BaL}) and 30 % (HIV-1_{SF162}) of the MDMs were infected compared to control in the absence of T20 (figure 4B and D). These results are consistent with the partial inhibition of HIV-1 replication observed in MDMs and suggest that after 2 hours, part of the viral particles has already fused into MDMs in coculture and are no longer accessible to antibodies. Interestingly, NAbs were able to inhibit viral particles reinfected the MDMs (inhibition curves below T20 value). These results indicates that NAbs

are able to effectively inhibit virus not fused in MDMs as well as newly produced viral particles reinfecting the MDMs.

Interestingly, non-neutralizing inhibitory antibody 246-D capable of inhibiting HIV replication *via* binding to Fc receptors on MDMs (15), also inhibited replication of HIV-1 in MDMs in the coculture. Surprisingly, anti-gp41 NAbs 2F5 and 4E10 had no efficacy to inhibit HIV-1_{BaL} replication in MDMs in similar extent than non-neutralizing antibodies 4B3 and 3D6 (figure 4A).

Moreover, after 40 hours of coculture, T20 almost completely inhibited HIV-1 transfer to primary PBLs (figure 4B and D).

Taking together, these results demonstrate that monoclonal neutralizing and non-neutralizing inhibitory antibodies are able to efficiently inhibit the replication of HIV-1 and newly produced viral particles reinfecting the MDMs.

Discussion:

HIV-1 cell-to-cell transfer has been described as particularly effective and facilitating virus spread in the body. Although the virus transfer from MDDCs to CD4 T cells has been extensively studied (11, 13, 19, 21-24), very few data are available concerning transfer from MDMs to T cells (9, 10) and none at an early time point.

In this study, we used primary MDMs and autologous PBLs to study HIV-1 transfer from MDMs to PBLs at an early time point and its inhibition by neutralizing antibodies. We demonstrated for the first time an efficient HIV-1 *trans*- and *cis*-transfer from MDMs to PBLs using two different viral strains. Interestingly, for HIV-1_{BaL} viral strain the percentage of MDMs infected in the coculture is lower than when MDM are cultured alone. Opposite results were obtained when analyzing transfer of HIV-1 from MDDCs to CD4 T cells (19) and from Langerhans (LCs) and interstitial dendritic cells (IDCs) to T cells (Maryse Peressin, personal communication), suggesting that different APCs subtypes differentially express cellular restriction factors in presence of CD4 T cells.

We demonstrated that neutralizing antibodies are able to efficiently inhibit *trans*- and *cis*-transfer of two HIV-1 viral strains from MDMs to PBLs whereas non-neutralizing antibodies have no inhibitory activity on this transfer. On contrary, both neutralizing antibodies and non-neutralizing inhibitory antibodies are able to efficiently inhibit viral replication in MDMs and to neutralize MDMs reinfection by newly synthesized virions even if added two hours after the incubation of MDMs with the virus.

We finally described that neutralizing antibodies directed against gp41 have a similar activity on HIV-1 transfer from MDMs to PBLs, from MDDCs to CD4 T cells and infection of PBLs by free viral particles. Very interestingly, neutralizing antibodies directed against gp120 inhibit more efficiently HIV-1 transfer from MDMs to PBLs than infection of PBLs by free virus, HIV-1 transfer from MDDCs to CD4 T cells and HIV-1 transfer from LCs/IDCs to CD4 T lymphocytes (Maryse Peressin, personal communication). Of note, efficiency of NAbs on HIV-1 transfer depends both of HIV-1 viral strain and type of donor cells (figures 3 and S2), with inhibitory activity of anti-gp120 NAbs being higher than the one of anti-gp41 NAbs (figure 2A and C), suggesting different transfer mechanisms allowing a better efficiency of some combination virus/antibody. Moreover, it has been shown that Fc γ receptor I (CD64),

highly expressed on MDMs, increase the inhibitory activity of neutralizing antibodies on MDMs infection by free viral particles (14). Therefore, it is possible that the high expression of CD64 on MDMs surface increases the efficiency of neutralizing antibodies on the HIV-1 transfer from MDMs to PBLs compared to the transfer from MDDCs, LCs and IDCs. Furthermore, we already know that anti-gp41 NAbs 2F5 and 4E10 have a hydrophobic region CDRH3 (complementary-determining region of the heavy chain) allowing them to recognize lipid components {Haynes, 2005 #260}. Thus, we can hypothesize that the non-specific fixation to lipids reduce neutralizing efficiency of these antibodies. Ofek and colleagues generated a 2F5 mutated in the loop of the CDRH3 region unable to recognize lipids. This mutant neutralized HIV-1 ten-fold more efficiently than the wild-type 2F5 {Ofek, 2010 #370}. We can hypothesize that this variant would have a similar activities as anti-gp120 NAbs in the transfer of HIV-1 to CD4 T cells and free viral particles, implying a major effect of the non-specific fixation of the antibody to lipids.

Altogether, our study demonstrates for the first time that macrophages efficiently transfer HIV-1 to PBLs through *trans*- and *cis*-mechanisms, which are both inhibited by neutralizing antibodies. These very hopeful results provide compelling evidence that such antibodies would be to be induced by vaccination to prevent virus dissemination after sexual infection.

Materials and methods:

Antibodies

Mouse anti-human CD3-PE (clone UCHT1), CD209-PerCP-Cy5.5 (DCN46) and CD64-APC (clone 10.1) were purchased from BD Pharmingen™. Mouse anti-human CD64-RPE-Cy5 (clone 10.1) was from AbD Serotec. VioBlue-conjugated mouse anti-human CD3 (BW264/56) was from Miltenyi Biotec. Ag p24 KC57-FITC (FH190-1-1) was purchased from Beckman-Coulter.

IgG1 2G12 (directed against gp120), 2F5, and 4E10 (against gp41) NAbs were obtained from Polymun Scientific. Monoclonal NAbs directed against the CD4-binding site were kindly provided by D. Burton (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for IgG1 b12 and by J. R. Mascola (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) for VRC01. Inhibitory mAbs IgG1 246-D and 4B3 (against gp41) were kindly provided by S. Zolla-Pazner (New York University School of Medicine, NY) and Polymun Scientific GmbH, respectively.

Cell preparation

Blood samples were collected from anonymous healthy donors (EFS, Alsace, Strasbourg).

Monocytes and non-activated peripheral blood lymphocytes (PBLs) were obtained by centrifugal elutriation after Ficoll-Hypaque sedimentation of human peripheral blood leukocytes. PBLs were activated with phytohemagglutinin-A (PHA, 1 mg/mL, Sigma) in RPMI medium-10% fetal calf serum (FCS) supplemented with antibiotics (Penicilin and Streptomycin, 100 Units/mL and 100 µg/mL, respectively) at the concentration of $10 \cdot 10^6$ cells/mL for 30 minutes. Cells were then cultivated in RPMI medium-10% FCS supplemented with antibiotics at $2 \cdot 10^6$ cells/mL. After 3 days, cells were frozen and thawed 1 day before use. MDMs were generated by differentiation of monocytes for 5 to 7 days in AIM medium (Gibco) supplemented with GlutaMax 1X (Gibco) and GM-CSF (10 ng/mL, R&D Systems) in a 48-wells plate (250 µL/well) at a concentration of $1,5 \cdot 10^6$ cell/mL (fresh cells) or $2 \cdot 10^6$ cells/mL (thawed cells).

Immatures MDDCs and PHA-activated CD4 T lymphocytes were obtained as previously described (19).

Virus preparation

HIV-1_{BaL} and HIV-1_{SF162} isolates (subtype B, R5 strain) were provided by S. Gartner, M. Popovic, and R. Gallo (NIH) and by the National Institute for Biological Standards and

Control (NIBSC), respectively. HIV-1 primary isolates were produced on human blood leukocytes, as described previously {Holl, 2006 #173}. Virus stocks collected at peak virus production were concentrated 70-fold with a 100-kDa cutoff polyethersulfone filter (Centricon Plus-70 Biomax Filter, Millipore).

HIV-1 transfer experiments and antibody neutralization assays

MDMs were incubated with primary R5 HIV-1 isolate (approximately 200 and 500 ng/ml viral p24 antigen for HIV-1_{BaL} and HIV-1_{SF162} respectively) for 2 hours. Cells were then washed thoroughly to remove unbound viral particles.

Next, MDMs were incubated with 50 μ L of autologous non-infected PHA-activated PBL at 7×10^6 cells/mL in AIM + GM-CSF (10 ng/mL, R&D Systems) + IL-2 (0,1 μ g/mL, R&D System), 50 μ L of human mAbs and 50 μ L of AIM + GM-CSF (10 ng/mL, R&D Systems) + IL-2 (0,1 μ g/mL, R&D System) medium. Productive infection in both cell populations was assessed after 40 hours of culture by detection of intracellular viral p24 antigen by flow cytometry (figure S1).

To study HIV-1 fusion and replication steps in MDMs and autologous PHA-activated PBLs, fusion inhibitor Fuzeon (T20, 10 μ g/mL) or protease inhibitor Indinavir (IDV, 10^{-5} M) were added simultaneously as PBLs (T20 and IDV, AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH).

Conditions used for HIV-1 transfer from MDDCs to PHA-stimulated CD4 T lymphocytes were similar to those previously described (19).

Neutralizing activity of antibodies on PHA-stimulated PBL infection by free viral particles was assessed as previously described (14).

Cell staining and flow cytometry analysis

Cells were labeled with Live/Dead Fixable Dead Cell Stain fluorescence kit (Invitrogen/Applied Biosystems) for 15 minutes at room temperature. After washing, cells were incubated with a mixture of Abs directed against CD3 and CD64 cell-surface molecules for 10 minutes at 4°C. Cells were then washed, fixed and permeabilized using Cytotfix and Perm/Wash kit solutions (according to the manufacturer's instructions, BD Biosciences). Cells were then stained for intracellular viral p24, washed again, and analyzed by flow cytometry.

Multicolor data were acquired on a cytometer LSRII SORP (BD Biosciences, San Jose, CA). Cytometer setup and tracking calibration particles (CST, BD Biosciences) were used to ensure the consistency of fluorescence intensity measurements throughout all experiments. Compensation was achieved with a flow cytometry CompBeads kit (BD Biosciences). Gating on forward and side light scatter was used to exclude dead cells and debris from the analysis. Forward width and forward area were used to exclude doublet cells. The final analysis was performed and the graphical output was generated with FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistical Analysis

Pairwise comparisons were made using t tests (Mann-Whitney test). Values of * $p=0,025$ was considered to be statistically significant. All statistical calculations were performed with GraphPad Prism Version 5.03 software (GraphPad, San Diego, California, USA).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the support of EuroNeut 41 (FP7-HEALTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Sidaction, Fonds de dotation Pierre Bergé, Fondation Dormeur and ANRS grants. A.P. was supported by Sidaction grant.

Authorship Contributions

A.P. and S.S. performed the experiments; A.P. and C.M. analyzed the data; M.P., S.S., B.S., A.P., M.L., M.E.B., G.L., T.D. and C.M. contributed reagents/materials/analysis tools; A.P. and C.M. conceived, designed the experiments and wrote the paper.

Disclosure of Conflict of interest

The authors declare no conflicting financial interests.

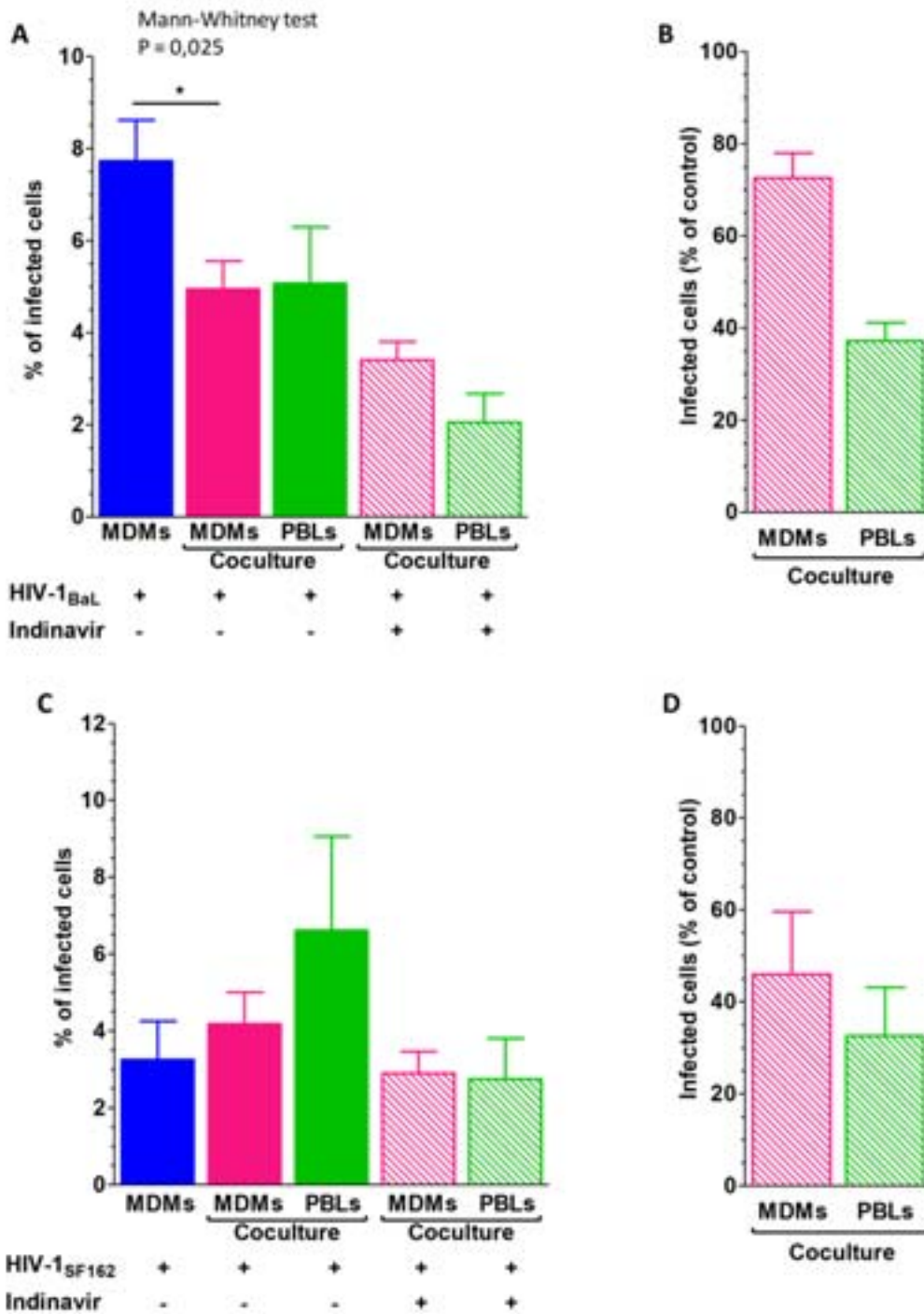


Figure 1: Efficient HIV-1 *trans*- and *cis*-transfer from MDMs to PBLs. Detection of intracellular (A) HIV-1_{BaL} and (C) HIV-1_{SF162} p24 in MDMs and primary autologous PHA-activated PBLs in presence or absence of indinavir (10^{-5} M) (N>6). Analysis of (B) HIV-1_{BaL} and (D) HIV-1_{SF162} *cis* versus *trans* transfer. Indinavir was added to the coculture at the same time as PBLs (N >4). Infection rates are calculated based on the percentage of control without Indinavir. Mean \pm SEM are shown.

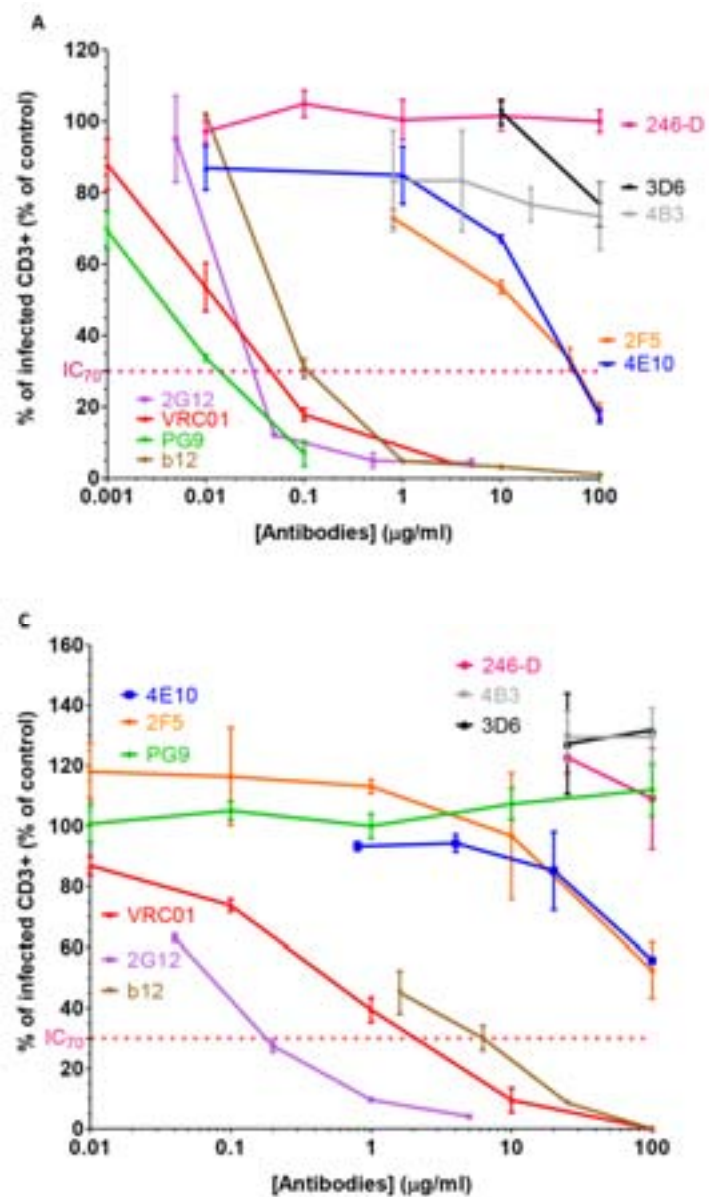


Figure 2: Nabs inhibit HIV-1 *trans*- and *cis*-transfer from MDMs to PBLs. Inhibition of (A, B) HIV-1_{lab} and (C) HIV-1_{SF162} transfer by various HIV-1-specific antibodies. Values correspond to (A, C) the percentage of infection in the presence of Abs compared to control without Abs. Dashed line represent IC₇₀ (Mean ± SD are represented), (B) the IC₇₀ of NAbs in absence (filled bars) or presence (striated bars) of indinavir (Mean ± SEM are represented). NAbs anti-gp120: PG9, VRC01, 2G12 and b12; NAbs anti-gp41: 2F5 and 4E10; NNIAbs: 4B3 and 246-D; NNNIAbs: 3D6.

		IC ₇₀ , µg/mL				
		HIV-1 _{Bal}		HIV-1 _{SF162}		
Neutralizing IgG	@gp41	2F5	43,4 ± 14,6	N = 3	> 100	N = 5
		4E10	58,3 ± 8,7	N = 5	> 100	N = 4
	@gp120	b12	0,14 ± 0,08	N = 2	3,9 ± 3,2	N = 2
		VRC01	0,09 ± 0,07	N = 3	2,8 ± 0,9	N = 2
		2G12	0,04 ± 0,04	N = 6	0,5 ± 0,4	N = 3
		PG9	0,02 ± 0,005	N = 3	> 100	N = 1
NNI IgG	246-D	> 100	N = 3	> 100	N = 1	
	4B3	> 100	N = 2	> 100	N = 1	
NN IgG	3D6	> 100	N = 3	> 100	N = 1	

Potent		Weak
	< 0,1 µg/mL	> 100 µg/mL
	0,1 - 1 µg/mL	10 - 100 µg/mL
	1 - 10 µg/mL	

Table 1: Inhibition of HIV-1 transfer from MDMs to PBLs. The inhibitory activity of mAbs added at different concentrations was analyzed in the HIV-1_{Bal} and HIV-1_{SF162} transfer assays. The values correspond to the IC₇₀ (concentration of antibody able to inhibit HIV-1 transfer by 70%).

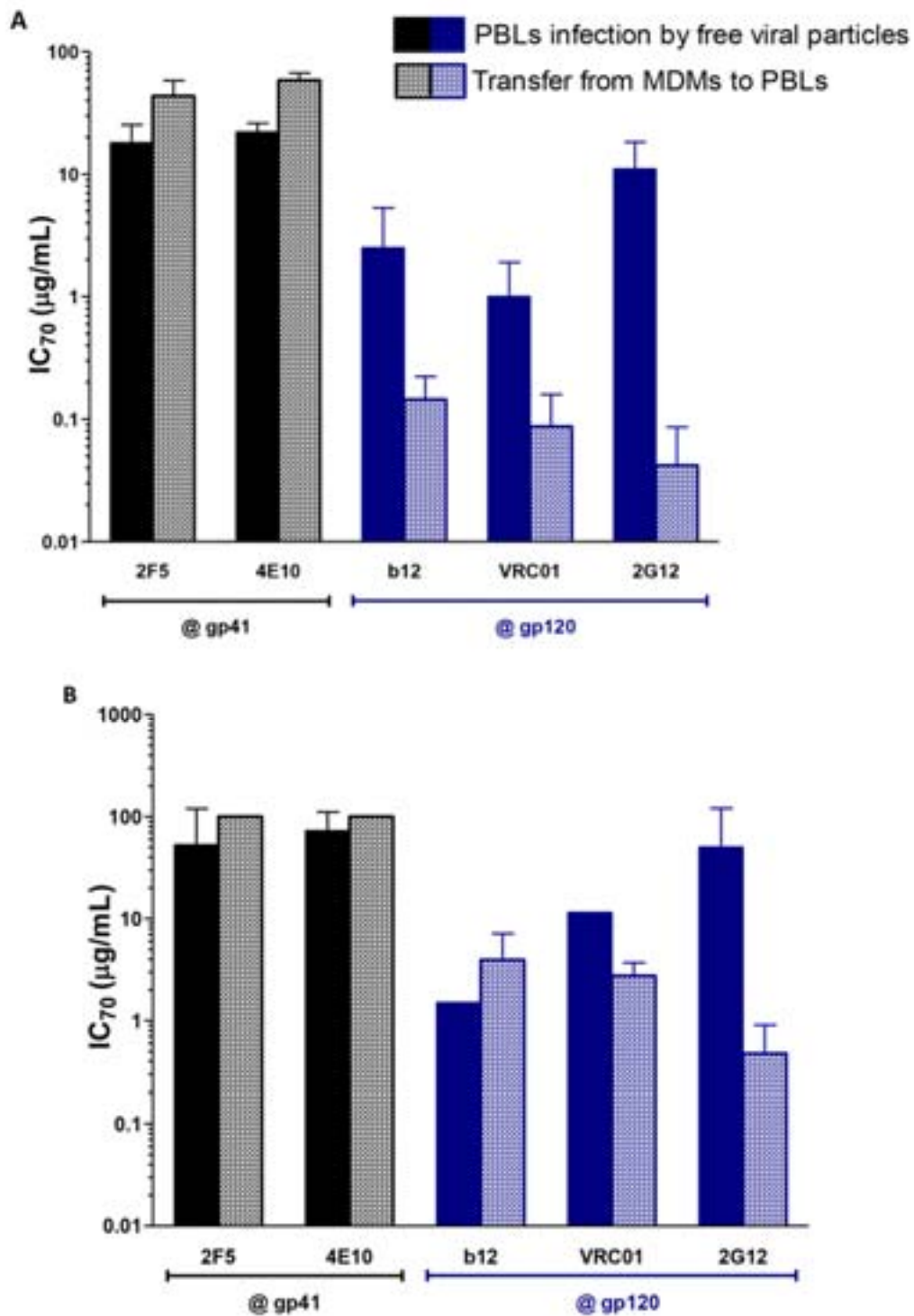


Figure 3: Comparison of anti-HIV-1 antibodies inhibitory efficiency on (A) HIV-1_{10L} and (B) HIV-1_{SF162} transfer from MDMs to PBLs *versus* PBL infection by free virions. Values correspond to the IC₇₀, i.e antibody concentration able to inhibit HIV-1 transfer by 70%. Means ± SD are shown.

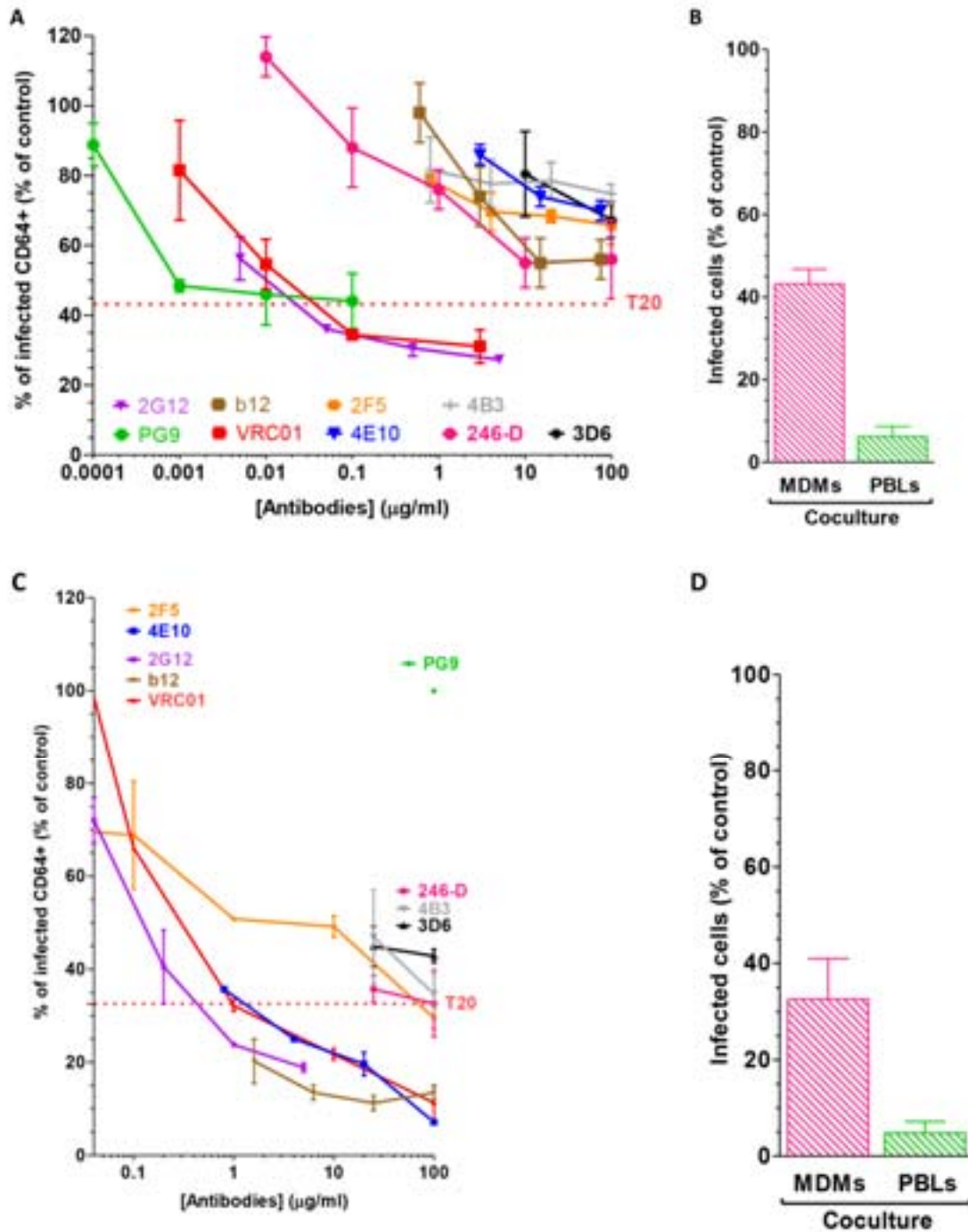


Figure 4: Abs inhibit HIV-1 replication and newly produced virions reinfecting MDMs
 Inhibition of (A) HIV-1_{Bal} and (C) HIV-1_{SF162} replication in MDMs in coculture by various HIV-1-specific antibodies. Values correspond to the percentage of infection in the presence of a panel of Abs compared to control without Abs. NAbs anti-gp120: PG9, VRC01, 2G12 and b12; NAbs anti-gp41: 2F5 and 4E10; NNIAbs: 4B3 and 246-D; NNNIAbs: 3D6. Mean ± SD are shown. (B) HIV-1_{Bal} and (D) HIV-1_{SF162} membrane fusion in MDMs and PBLs. T20 (10 µg/mL) was added to the coculture at the same time as PBLs (N > 7). The infection rates are calculated based on the percentage of control without T20. Mean ± SEM are shown.

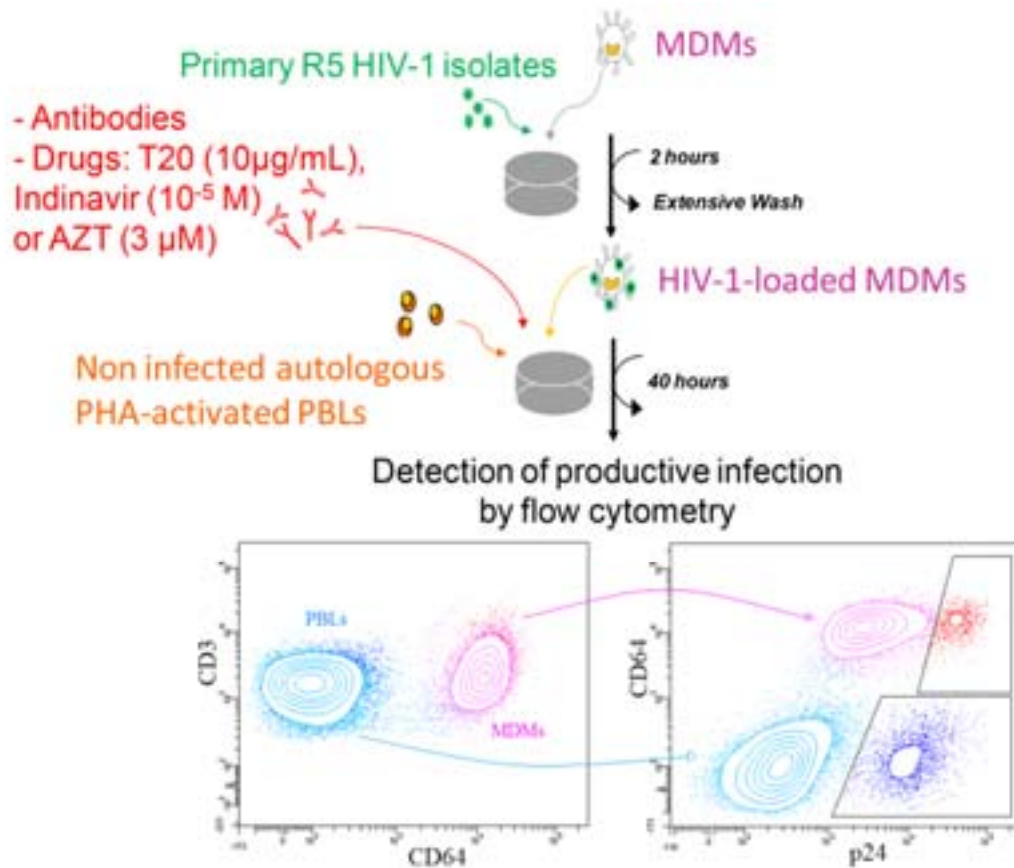


Figure S1: Schematic representation of the HIV-1-transfer assay. MDMs were incubated for 2 h with HIV-1 primary isolate and then washed fifth extensively. MDMs were then cocultured for 40 hours with uninfected autologous PHA-activated PBLs in presence or absence of monoclonal antibodies or drugs. Productive infection in each cell population was determined by detection of intracellular viral p24 antigen by flow cytometry. T20: fusion inhibitor. AZT : azidothymidine, reverse transcriptase inhibitor . Indinavir: protease inhibitor. PHA: phytohemagglutinin-A.

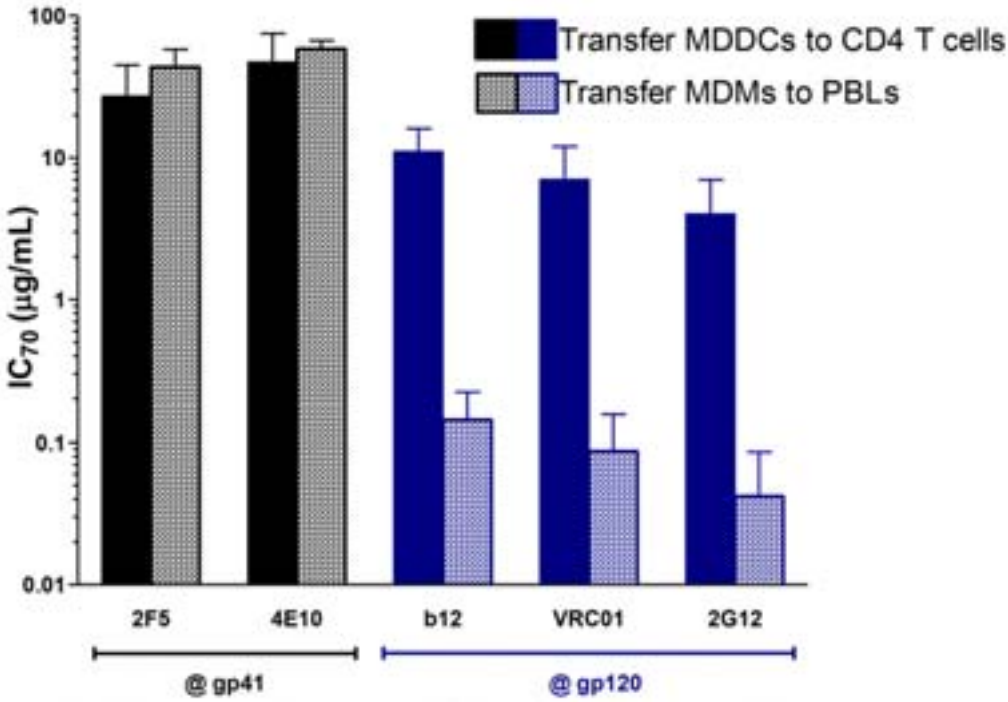


Figure S2: HIV-1_{Bal} transfer from MDDCs to CD4 T cells versus HIV-1 transfer from MDMs to PBLs. Values correspond to the IC₇₀. Means ± SD are shown.

Références

1. Royce R, Seña A, Cates W, Cohen M. Sexual transmission of HIV. *The New England journal of medicine*. 1997;336(15):1072-8.
2. Srivastava IK, Ulmer JB, Barnett SW. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Human vaccines*. 2005;1(2):45-60. Epub 2006/10/14.
3. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham C, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature medicine*. 1997;3(12):1369-75.
4. Shattock R, Moore J. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature reviews Microbiology*. 2003;1(1):25-34.
5. Shen R, Richter H, Smith P. Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2011;65(3):261-7.
6. Collman R, Perno C-F, Crowe S, Stevenson M, Montaner L. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(5):631-4.
7. Sharova N, Swingle C, Sharkey M, Stevenson M. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *The EMBO journal*. 2005;24(13):2481-9.
8. Carr J, Hocking H, Li P, Burrell C. Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology*. 1999;265(2):319-29.
9. Gousset K, Ablan S, Coren L, Ono A, Soheilian F, Nagashima K, et al. Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS pathogens*. 2008;4(3).
10. Groot F, Welsch S, Sattentau Q. Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood*. 2008;111(9):4660-3.
11. Turville S, Santos J, Frank I, Cameron P, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103(6):2170-9.
12. Wu L, KewalRamani V. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(11):859-68.
13. Cavrois M, Neidleman J, Kreisberg J, Greene W. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS pathogens*. 2007;3(1).
14. Holl V, Hemmerter S, Burrell R, Schmidt S, Bohbot A, Aubertin A-M, et al. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(10):6274-83.
15. Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, Aubertin A-M, et al. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *Journal of virology*. 2006;80(12):6177-81.
16. Peressin M, Holl V, Schmidt S, Decoville T, Mirisky D, Lederle A, et al. HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies. *Journal of virology*. 2011;85(2):1077-85.
17. Yu H, Reuter M, McDonald D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS pathogens*. 2008;4(8).
18. Sagar M, Akiyama H, Etemad B, Ramirez N, Freitas I, Gummuluru S. Transmembrane domain membrane proximal external region but not surface unit-directed broadly neutralizing HIV-1 antibodies can restrict dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(8):1248-57.
19. Su B, Xu K, Lederle A, Peressin M, Biedma M, Laumond G, et al. Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood*. 2012;120(18):3708-17.

20. Walker L, Phogat S, Chan-Hui P-Y, Wagner D, Phung P, Goss J, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science (New York, NY)*. 2009;326(5950):285-9.
21. Piguet V, Sattentau Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(5):605-10.
22. Felts R, Narayan K, Estes J, Shi D, Trubey C, Fu J, et al. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(30):13336-41.
23. Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*. 2006;108(5):1643-51.
24. Sattentau Q. Cell-to-Cell Spread of Retroviruses. *Viruses*. 2010;2(6):1306-21.
25. Haynes B, Fleming J, St Clair E, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, et al. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5730):1906-8.
26. Ofek G, McKee K, Yang Y, Yang Z-Y, Skinner J, Guenaga F, et al. Relationship between antibody 2F5 neutralization of HIV-1 and hydrophobicity of its heavy chain third complementarity-determining region. *Journal of virology*. 2010;84(6):2955-62.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

➤ Conclusion générale

Actuellement, le virus de l'immunodéficience humaine est transmis majoritairement par voie hétérosexuelle (environ 80% des nouvelles infections). Le développement d'un vaccin efficace induisant une réponse immunitaire forte combinant une réponse cellulaire et une réponse humorale spécifique est à l'heure actuelle primordial. En effet, les études sur le modèle primate non humain indiquent que les anticorps et les cellules T CD8⁺ peuvent respectivement prévenir de l'acquisition du virus et diminuer la réplication virale (Girard and Plotkin, 2012) et démontrent ainsi l'importance d'une réponse immunitaire constituée à la fois d'une réponse à médiation cellulaire et d'une réponse humorale.

Le transfert du VIH-1 de cellules à cellules a été décrit comme particulièrement efficace et permettant une dissémination du virus dans l'organisme. Afin de mieux comprendre les mécanismes de protection contre l'infection conférés par des anticorps spécifiques ainsi que l'activité de ces anticorps sur le transfert du virus des cellules présentatrices d'antigènes aux cellules T CD4, des études *in vitro* sur des modèles de transfert à partir de cellules primaires présentes dans les muqueuses sont essentielles.

A l'heure actuelle, la majorité des données sur le transfert du VIH-1 aux cellules T CD4 ont été obtenues avec des lignées cellulaires ou des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs) comme cellules donneuses. Très peu d'études se sont rapprochées des conditions physiologiques en étudiant le transfert du VIH-1 des LCs ou des MDMs aux lymphocytes T CD4. En effet, seule une étude a analysé le transfert *in cis* du VIH-1 des MDMs aux lymphocytes T CD4 et ne s'est pas intéressée au transfert du virus *in trans*. De plus, nous ne disposons d'aucunes données sur l'inhibition du transfert du VIH-1 de ces APCs aux cellules T CD4 par les anticorps neutralisants, cette inhibition pouvant à son tour prévenir la dissémination du virus dans l'organisme.

Au cours de ma thèse, afin d'approcher des conditions physiopathologiques d'infection par voie sexuelle: j'ai déterminé les mécanismes de transfert du VIH-1 dans ces différentes APCs (MDMs et LCs/IDCs) présentes dans les muqueuses aux lymphocytes T CD4 et étudié l'activité inhibitrice des anticorps sur ces transferts.

➤ Mécanismes de transfert du VIH-1 de cellules présentatrices d'antigènes aux cellules T CD4

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de transfert du VIH-1 des APCs aux lymphocytes T CD4 (manuscrits 1 et 2).

Nous avons tout d'abord mis en évidence un transfert efficace du VIH-1 des LCs/IDCs et MDMs aux lymphocytes T CD4. Nous avons démontré que la cinétique de transfert des LCs/IDCs est différente de celle des MDMs. En effet, elle est plus rapide sur les MDMs (2j *versus* 3j). Ce transfert rapide est associé à un pourcentage élevé de transfert *in trans* (transfert direct du virus, sans production de VIH par les MDMs) dans les MDMs (50% de transfert *in trans* et 50% de transfert *in cis*).

De plus, nous avons observé une fusion plus efficace dans les MDMs par rapport aux LCs/IDCs impliquant l'entrée virale dans les MDMs *via* la liaison du virus au récepteur et co-récepteur. Cette fusion rapide permet une infection forte des MDMs. Néanmoins, cette réplication virale est plus faible en présence de lymphocytes T CD4 que celle observée en absence de cellules T, suggérant une redirection du virus vers sa cible principale, les lymphocytes T CD4, dans les co-cultures. La fusion du virus observée dans les MDMs pourrait limiter le pourcentage de particules virale restant liées à la surface de ces cellules. Cependant, nous observons un pourcentage élevé de virus transféré en *trans* démontrant que le passage du virus aux lymphocytes T CD4 est efficace.

Au contraire des MDMs, les LCs/IDCs transfèrent le VIH-1 aux cellules T CD4 majoritairement en *cis* (transfert suivant l'infection des APCs). La fusion et la réplication sont plus limitées dans ces DCs. Cependant, dans la co-culture LCs/IDCs, la présence de cellules T CD4 entraîne une augmentation de la réplication du VIH-1 dans ces DCs et ainsi un pourcentage élevé de virus transféré en *cis*. Ce phénomène lié à la présence des lymphocytes T CD4 n'est pas dépendant de la souche virale utilisée et a déjà été décrit dans les co-cultures MoDCs/cellules T CD4 (Holl et al., 2010; Su et al., 2012) mais son mécanisme précis n'a pas été identifié. Nous recherchons actuellement l'expression de facteurs de restriction cellulaires dans ces cellules. Nous avons démontré dans l'équipe que lorsque les MoDCs et les cellules T CD4 sont en coculture, l'expression de la protéine SAMHD1 dans les MoDCs est diminuée. Cette diminution est corrélée avec un accroissement de la réplication virale dans les MoDCs (Bin Su, communication personnelle). Cette étude suggère une levée de restriction de SAMHD1 dans les MoDCs en condition de coculture. Elle devrait donc être étendue aux LCs/IDCs et aux MDMs afin de confirmer ces données obtenues sur MoDCs.

Ainsi, nous avons démontré que les macrophages transfèrent très efficacement en *trans* des particules virales aux cellules T CD4. En outre, ce transfert diffère de celui observé dans LCs/IDCs, suggérant ainsi deux mécanismes de dissémination du virus. Nos résultats permettent de proposer un modèle de transmission du VIH au niveau des muqueuses. Les macrophages répliqueraient le VIH et les cytokines et chimiokines sécrétées localement par les macrophages favoriseraient le recrutement des lymphocytes T CD4 au niveau du site de l'infection. Les macrophages transmettraient alors le virus en *trans* rapidement aux lymphocytes T CD4 recrutés au niveau de la porte d'entrée du virus. Par la suite, les cellules dendritiques de types Langerhans et interstitielles qui ont capturé le VIH participeraient à la dissémination du virus plus tardivement suite à leur migration dans les organes lymphoïdes. Cette hypothèse serait à confirmer *in vivo* en suivant la migration et le transfert du VIH aux cellules T CD4 par microscopie. Le modèle macaque infecté expérimentalement avec un virus chimérique SHIV pourrait être utilisé pour suivre la dissémination du virus dans l'organisme. Il serait particulièrement intéressant d'utiliser un modèle d'infection expérimental avec des cellules infectées afin de se rapprocher du contexte de transfert de cellule à cellule dans un modèle animal. L'équipe de Roger Le Grand a démontré que les macaques peuvent être efficacement infectés par voie vaginale par du virus associé aux cellules. Ils ont observé ces cellules infectées dans les ganglions lymphatiques 21 heures après le challenge suggérant que

les cellules infectées migrent et transfèrent le virus dans des organes éloignés du site d'inoculation (Sallé et al., 2010).

Il a été proposé précédemment que les particules virales fixées à la surface des MoDCs *via* des récepteurs alternatifs (DC-SIGN, DCIR,...) pourraient être transférées efficacement aux lymphocytes T (Groot et al., 2008; Lambert et al., 2008 ; Martin and Sattentau, 2009; Piguet and Steinman, 2007). La molécule de DC-SIGN est peu exprimée à la surface des LCs/IDCs et des MDMs et ne peut donc pas contribuer au transfert du virus entre ces APCs et les lymphocytes T CD4. Cependant, d'autres récepteurs dits "alternatifs" jouent un rôle dans la liaison et la transmission du VIH-1: la molécule siglec-1 et les molécules de syndécans 1, 2 et 4 fortement exprimées à la surface dans MDMs mais pas ou peu exprimé à la surface des LCs et IDCs (Bobardt et al., 2003; Nguyen and Hildreth, 2003; Zou et al., 2011), la langerine exprimée exclusivement à la surface des LCs, le récepteur au mannose et le DCIR exprimés par les MDMs et les IDCs (Lambert et al., 2008; Nguyen and Hildreth, 2003). Ainsi, une liaison préférentielle du virus à la membrane de MDMs *via* les syndécans 1,2 ou 4 ou la molécule siglec-1 pourrait participer au transfert en *trans* plus efficace des MDMs aux cellules T CD4. Les molécules impliquées dans le transfert des MDMs aux lymphocytes T CD4 devront donc être caractérisées. La contribution des récepteurs alternatifs exprimés à la surface des APCs (langerine, récepteur au mannose, DCIR, siglec-1...) dans l'infection et le transfert du virus aux cellules T CD4 pourrait être analysée dans des expériences de compétition par incubation d'anticorps dirigés spécifiquement contre les différents récepteurs alternatifs des APCs. Ces expériences permettront de mieux définir les paramètres impliqués dans le transfert du VIH par différentes cellules afin de pouvoir les inhiber de manière efficace.

➤ Inhibition du transfert du VIH-1 des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4

Dans un second temps, nous avons étudié l'inhibition du transfert du VIH-1 des MDMs et LCs/IDCs aux lymphocytes du sang périphérique (PBLs) (manuscrits 1 et 2).

L'étude du mécanisme d'inhibition de l'infection par le virus libre réalisée dans le laboratoire a précédemment permis de montrer que les anticorps neutralisants de type IgA et IgG sont capables d'inhiber l'infection par le virus libre de nombreux types cellulaires, dont les lymphocytes T CD4 primaires, principales cibles du virus, et les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) des muqueuses. De plus, d'autres types d'IgG dépourvus d'activité neutralisante à proprement dite, nommé anticorps non-neutralisant inhibiteurs, inhibent également l'infection de ces cellules par un mécanisme dépendant des récepteurs Fcγ (Holl et al., 2006a; Holl et al., 2006b; Peressin et al., 2011)

Nous avons démontré que les anticorps neutralisants inhibent efficacement le transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des MDMs aux PBLs. Par contre, aucune activité inhibitrice des anticorps non-neutralisants inhibiteurs sur le transfert du virus n'a été observée, suggérant ainsi que seule l'activité neutralisante des anticorps neutralisants intervient dans le mécanisme d'inhibition du transfert. Nous envisageons d'élargir cette étude aux nouveaux anticorps

neutralisants décrit récemment (anticorps PGTs) et d'autres anti-gp41 afin de corroborer les différences d'activité.

En parallèle, l'étude de l'efficacité des anticorps spécifiques du VIH-1 sur la réplication des MDMs en co-culture avec des PBLs nous a permis de démontrer que les anticorps neutralisants inhibent partiellement la réplication virale dans les MDMs bien qu'ajoutés 2 heures après l'incubation des MDMs avec le virus. L'analyse des capacités de fusion virale dans les macrophages nous a permis de démontrer que les anticorps inhibent le virus qui n'a pas encore fusionné dans les macrophages. Les virus ayant déjà fusionné n'étant plus accessible aux anticorps. En outre, nous avons démontré que les anticorps neutralisants étaient également capable d'inhiber les particules virales nouvellement produites. De façon intéressante, les anticorps non-neutralisant inhibiteurs sont capable d'inhiber la réplication virale *via* une fixation aux récepteur Fc des MDMs aussi efficacement que le b12, un anticorps neutralisant.

Le transfert du virus de cellule à cellule étant plus efficace que l'infection par le virus libre, nous avons par la suite comparé les activités d'inhibition des anticorps neutralisants dans le transfert du VIH-1 des MDMs aux PBLs et la neutralisation dites "conventionnelle" (manuscrit 2).

Nous avons observé que lorsque les anticorps neutralisant anti-gp120 sont ajoutés à la culture en même temps que les cellules T CD4, l'inhibition du transfert du virus des MDMs aux lymphocytes T CD4 est environ 4 à 260 fois plus efficace que leur activité neutralisante (inhibition du virus libre). Au contraire, les anticorps neutralisants dirigés contre la gp41 du VIH-1 conservent une activité inhibitrice similaire en conditions de transfert du virus des MDMs aux PBLs par rapport à la neutralisation du virus libre. Cette augmentation d'activité inhibitrice des anticorps neutralisants anti-gp120 n'est pas observée dans les expériences de transfert du VIH-1 des LC/IDCs ou MoDCs aux lymphocytes T CD4.

Suite à la mise en évidence de différences dans les mécanismes de transfert décrits pour les différentes APCs (publication 1, manuscrits 1 et 2) nous avons comparé l'efficacité des anticorps neutralisants dans le transfert du VIH-1 aux cellules T à partir des MDMs, des MoDCs et des LCs/IDCs (manuscrits 1 et 2). L'activité neutralisante des anticorps dirigés contre la gp41 du VIH-1 est similaire à celle observée dans le transfert du VIH-1 des MDMs aux PBLs. Au contraire, celle des anticorps dirigés contre la gp120 est 75 à 1000 fois plus élevée dans le transfert du VIH-1 à partir des MDMs que dans le transfert du virus à partir des MoDCs et LCs/IDCs.

Le récepteur FcγI (CD64) est fortement exprimé à la surface des MDMs au contraire des MoDCs et augmente l'efficacité des anticorps neutralisants dans l'inhibition de l'infection des MDMs par le virus libre (Holl et al., 2004). Nous pouvons donc proposer que l'efficacité des anticorps sur le transfert des MDMs aux PBLs est également favorisée par la forte expression de la molécule CD64 sur les MDMs. L'incubation des MDMs avec un cocktail d'anticorps dirigés contre les récepteurs Fcγ avant l'ajout du VIH-1 (expériences de compétitions) nous a permis de corroborer cette supposition (résultats préliminaires). Cependant, malgré la spécificité des anticorps utilisés, tous les récepteurs Fcγ exprimés à la surface des MDMs ne

sont pas bloqué et l'importance des récepteurs Fc γ dans l'inhibition du transfert du VIH-1 des MDMs aux PBLs par les anticorps est peut être sous-estimée.

Cependant, cette hypothèse ne peut pas être prise en compte pour les anticorps 2F5 et 4E10. En effet, l'activité inhibitrice des anticorps 2F5 et 4E10 n'est pas modifiée dans le transfert des MDMs aux PBLs par rapport à la neutralisation du virus libre. Il a néanmoins été démontré précédemment que les anticorps neutralisants 2F5 et 4E10 possède une région hydrophobe (CDR H3) leur permettant de reconnaître des composants lipidiques (Haynes et al., 2005). Il est donc possible que la fixation non spécifique aux lipides de la membrane virale de ces anticorps diminue leur activité neutralisante dans le transfert du VIH. Ofek et ses collègues ont produit un anticorps 2F5 muté dans la boucle de sa région CDR H3 (Ofek et al., 2010). Ils ont démontré que les variants 2F5 possédant des substitutions tryptophane au niveau de cette boucle neutralisaient environ 10 fois plus efficacement le virus que l'anticorps 2F5 sauvage. Nous pouvons donc penser que ces variants auraient une activité neutralisante du même ordre de grandeur que celle des anticorps anti-gp120 à inhiber le transfert du VIH-1 aux cellules CD4 et le virus libre.

➤ **Perspectives : vers le développement d'un vaccin induisant des anticorps neutralisants et/ou inhibiteurs**

Un vaccin efficace contre le VIH devrait être capable d'induire une immunité durable et de prévenir l'acquisition de l'infection et/ou de diminuer la réplication virale chez les personnes infectées afin de ralentir l'évolution de la maladie et de réduire la transmission du virus (Johnston and Fauci, 2007; Virgin and Walker, 2010). A l'heure actuelle, il est admis que le développement d'un vaccin contre le VIH doit reposer sur l'induction d'anticorps exerçant des activités neutralisantes ainsi que des activités inhibitrices de type ADCC et ADCVI.

Il a été démontré que le transfert passif d'anticorps neutralisants, en particulier les anticorps neutralisants à large spectre tels que le b12, le 2G12, le 2F5 ou le 4E10, protège les macaques rhésus contre l'infection expérimentale par le SIV et le SHIV par voies intraveineuse ou orale (Baba et al., 2000; Shibata et al., 1999), par voie vaginale (Hessell et al., 2009a; Hessell et al., 2009b; Mascola, 2002) ou par voie rectale (Hessell et al., 2010). La "vaccination génétique" par immunisation des macaques rhésus avec un vecteur adénoviral exprimant des immunoadhésines dérivées d'anticorps neutralisants à large spectre peut également protéger de l'infection comme l'a démontré l'étude de Johnson et ses collègues. Les macaques ont montré une activité neutralisante de longue durée dans leur sérum et ont été totalement protégés contre le challenge SIV administré par intraveineuse (Johnson et al., 2009). Cette étude a été confirmée sur un modèle de souris humanisées totalement protégées de l'infection par le VIH-1 par injection intramusculaire de vecteur exprimant des anticorps neutralisants du VIH-1 (b12, 2G12, 4E10 ou 2F5) (Balazs et al., 2012). Par conséquent, les anticorps neutralisants à large spectre protègent contre l'infection expérimentale même si leur rôle dans le contrôle de la virémie chez l'hôte serait limité (Euler et al., 2010; Poignard et al., 1999; Stamatatos et al., 2009a).

Cependant, les anticorps neutralisants à large spectre sont très complexes et résultent d'une longue maturation rendant leur induction par vaccination extrêmement délicate. L'induction d'anticorps non-neutralisants inhibiteurs (AcNNI) pourrait alors être une alternative. Ces anticorps sont dépourvus d'activité neutralisante mais possédant une activité inhibitrice *via* des mécanismes dépendants des récepteurs Fc.

Néanmoins, bien que nous ayons démontré dans nos études que les AcNNI ont une activité inhibitrice sur la réplication du VIH-1 dans les APCs, nos résultats montrent qu'ils ne sont pas efficaces dans l'inhibition du transfert du VIH-1 des APCs aux cellules T CD4. Concrètement, afin que les AcNNI protègent de l'infection par le VIH-1 ils devraient être induits tôt, avant contact des cellules avec le virus et dans des concentrations suffisantes pour inhiber l'infection de toutes les cellules cibles. Les essais expérimentaux *in vivo* chez le macaques n'ont démontré que des protections partielles des animaux par les AcNNI contre les différents challenges d'infection (Burton et al., 2011; Moog et al., 2013). Ces résultats suggèrent que les AcNNI ne sont pas capables à eux seuls de protéger de l'infection par le VIH-1. Cependant, ces infections expérimentales sont assez éloignées des conditions physiologiques de l'infection par le VIH-1 chez l'Homme. Il est en effet à noter qu'afin d'obtenir une meilleure évaluation statistique des résultats d'infection des macaques, les cycles menstruels des animaux sont synchronisés en phase lutéale avec du depro-provera. Cela provoque un affinement de la muqueuse vaginale des macaques et les virions peuvent accéder plus rapidement aux cellules présentes dans la *lamina propria*. De même, les inocula utilisés dans les challenges vaginaux sont généralement élevés afin de favoriser une infection efficace. Ces inoculations de hautes doses de virus ne reflètent pas les conditions d'infection par le VIH-1 chez l'Homme pour lequel les risques d'une contamination par voie sexuelle sont faibles. De plus, pour l'instant, les infections expérimentales sont réalisées avec du virus libre ce qui ne permet pas d'étudier le rôle des anticorps dans la transmission précoce du VIH par les cellules infectées. En effet, lors d'une infection par le VIH chez l'Homme, des virus libres ainsi que des virus associés aux cellules sont transmis. Des infections expérimentales de cellules infectées aux macaques pourraient permettre de se rapprocher des conditions physiologiques et d'étudier le transfert du virus de cellule à cellule (Sallé et al., 2010).

La protection non complète des macaques par les AcNNI lors de ces challenges peut donc s'expliquer par une concentration en virus trop élevée ou en AcNNI trop faible. Toutes les cellules présentes dans la muqueuse ne seraient donc pas protégées de l'infection par le VIH-1 et les APCs de la muqueuse transfèreraient efficacement le virus aux cellules T CD4, échappant ainsi aux AcNNI incapables d'inhiber ce transfert. Cela démontrent l'importance des anticorps neutralisants inhibant à la fois la réplication virales dans les cellules cibles mais également le transfert du virus aux cellules T dans la lutte contre l'infection par le VIH-1.

Nos différentes études et essais réalisés *in vitro* suggèrent que les anticorps conférant une protection stérilisante optimale contre l'infection par voie sexuelle devraient être constitués d'une partie Fab possédant une activité neutralisante forte capable de protéger de l'infection par le virus libre et le transfert du VIH-1 de cellules à cellules ainsi qu'une partie Fc capable d'induire une activité antivirale dépendante des récepteurs Fc γ . Un vaccin capable d'induire de tels anticorps associé à une réponse cytotoxique forte pourrait permettre une protection contre le VIH-1 lors d'une transmission par voie sexuelle.

ANNEXES

PUBLICATION 1

Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes

Bin Su,¹ Ke Xu,¹ Alexandre Lederle,¹ Maryse Peressin,¹ Marina Elizabeth Biedma,¹ Géraldine Laumond,¹ Sylvie Schmidt,¹ Thomas Decoville,¹ Alizé Proust,¹ Mélanie Lambotin,¹ Vincent Holl,¹ and Christiane Moog¹

¹Inserm U748, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Dendritic cells (DCs) support only low levels of HIV-1 replication, but have been shown to transfer infectious viral particles highly efficiently to neighboring permissive CD4 T lymphocytes. This mode of cell-to-cell HIV-1 spread may be a predominant mode of infection and dissemination. In the present study, we analyzed the kinetics of fusion, replication, and the ability of HIV-1-specific Abs to inhibit HIV-1 transfer from immature DCs

to autologous CD4 T lymphocytes. We found that neutralizing mAbs prevented HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes in *trans* and in *cis*, whereas nonneutralizing Abs did not. Neutralizing Abs also significantly decreased HIV-1 replication in DCs, even when added 2 hours after HIV-1 infection. Interestingly, a similar inhibition of HIV-1 replication in DCs was detected with some nonneutralizing Abs and was correlated with DC maturation.

We suggest that the binding of HIV-1-specific Abs to FcγRs leads to HIV-1 inhibition in DCs by triggering DC maturation. This efficient inhibition of HIV-1 transfer by Abs highlights the importance of inducing HIV-specific Abs by vaccination directly at the mucosal portal of HIV-1 entry to prevent early dissemination after sexual transmission. (*Blood*. 2012;120(18):3708-3717)

Introduction

Transmission via the sexual mucosa is the main route of HIV-1 infection worldwide.¹ HIV-1 infection generally begins in the genital mucosal tissues, but the cellular mechanisms leading to HIV-1 infection remain unclear. The mucosal tissues contain various types of immune cells, including dendritic cells (DCs), which are among the cells initially targeted by HIV-1.^{2,3} The DCs lining the genital mucosa are APCs initiating a potent immune response.^{2,4} HIV-1 subverts Ag processing in DCs, resulting in viral uptake, infection, and transfer.²

Several studies have shown that different types of DCs are infected by HIV-1 in vivo, in the SIV-infected macaque model,^{5,6} or ex vivo in vaginal epithelial explants.³ In vitro, immature DCs replicate CCR5 (R5)-tropic viruses, albeit less efficiently than primary CD4 T lymphocytes.^{7,9} Furthermore, interactions between DCs and HIV-1 have highlighted their important role in HIV-1 transmission. The efficient transfer of HIV-1 from DCs to CD4 T lymphocytes, first described in 1992,¹⁰ may largely contribute to HIV-1 propagation and dissemination through the body,¹⁰⁻¹⁶ but the precise mechanisms leading to HIV-1 transfer remain unclear.^{17,18} DCs bind native free viral particles, but viruses are rarely colocalized with endolysosomal markers, suggesting that viral infection may alter endolysosomal trafficking.¹⁹

Two modes of HIV-1 transfer have been well described: *trans*-infection and *cis*-infection.^{18,20} Infectious viral particles in the intracellular compartments of DCs can be rapidly redirected to virological synapses formed at the site of contact between infected DCs and CD4 T lymphocytes.^{11,19-22} This *trans*-infection may also be mediated by DC-derived exosomes released from immature monocyte-derived dendritic cells (MoDCs).²³ In addition, HIV-1 bound to C-type lectins, such as DC-SIGN, on the surface of

immature DCs can be efficiently captured and transferred directly to CD4 T lymphocytes during cell-to-cell contact.^{12,17,24,25} This HIV-1 transfer, also referred to as *trans*-infection, occurs in the absence of viral replication in DCs.¹² This *trans*-infection of CD4 T lymphocytes is transient, because HIV-1 transfer decays within 24 hours¹⁹ after the addition of CD4 T lymphocytes to infected DCs.²⁶ A second transfer phase is then detected in immature DCs after 48 hours as an azidothymidine (AZT)-sensitive increase in proviral DNA levels.¹⁹ This second type of transfer, in *cis*, occurs over a longer period, after conventional HIV-1 fusion and de novo virus production in immature DCs.¹⁹ The mechanism of viral transfer from DCs to CD4 T lymphocytes can therefore be addressed as a function of time: the addition of CD4 T lymphocytes to DCs just after their exposure to HIV-1 may allow the analysis of HIV-1 transfer in *trans*, whereas the addition of CD4 T lymphocytes 1 day after DC infection is likely to promote transfer in *cis*.

It has been suggested that the transfer of viral particles from MoDCs to CD4 T lymphocytes is resistant to neutralizing Abs (NAbs).^{8,25} The investigators suggested that the virological synapse between infected DCs and CD4 T lymphocytes impeded the binding of NAbs to the transferred virus.⁸ In contrast, other studies have reported HIV-1 transfer to be sensitive to NAbs.^{14,27,28} We previously showed that HIV-1-exposed immature MoDCs produce large numbers of new viral particles when cocultured with primary CD4 T lymphocytes.²⁸ The HIV-1 particles produced by DCs and released into the supernatant may interfere with the Ab-mediated inhibition of HIV-1 transfer to T cells, because Abs can inhibit HIV-1 transfer to T cells but not HIV-1 production in DCs. This would result in the release of HIV-1 into the supernatant despite the

Submitted March 22, 2012; accepted August 24, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 6, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-03-418913.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

efficient inhibition of HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes. We therefore analyzed the intracellular p24 of HIV-1 produced in DCs and in CD4 T lymphocytes directly, rather than assessing HIV-1 release into the supernatant, to make it possible to distinguish between the virus produced by DCs and that transferred to CD4 T lymphocytes. We found that the addition of NAbs to HIV-1–loaded DCs at the same time as CD4 T lymphocytes strongly inhibited the *trans*- and *cis*-infection of primary CD4 T lymphocytes with HIV-1, whereas nonneutralizing Abs (NNAbs) had no inhibitory activity. Surprisingly, both NAbs and some NNAbs decreased the percentage of infected MoDCs in the coculture. This decrease was correlated with the level of DC maturation.

Methods

Abs

Mouse anti-human CD3-VioBlue (BW264/56) and CD83-APC (HB15) mAbs were purchased from Miltenyi Biotec. PerCP-Cy5.5–conjugated mouse mAb against human CD209 (DC-SIGN, DCN46) was purchased from BD Pharmingen. HIV-1 Ag p24 KC57-FITC (FH190-1-1) and goat F(ab')₂ fragment anti-human IgG (Fcγ)-PE Abs were purchased from Beckman-Coulter. The IgG1 2G12 (directed against gp120), 2F5, and 4E10 (against gp41) NAbs were obtained from Polymun Scientific. For monoclonal NAbs directed against the CD4-binding site, the IgG1 b12 was kindly provided by D. Burton (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) and the VRC01 and VRC03 by J. R. Mascola (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD). Inhibitory mAbs IgG1 246-D, 4B3, and 5F3 (against gp41) were kindly provided by S. Zolla-Pazner (New York University School of Medicine, NY) and Polymun, respectively. The NNAbs IgG1 1570-D (NIH 1172 against the CD4 binding site) was obtained from the NIH (Bethesda, MD). Monoclonal anti-dengue Ab (DEN-3) was obtained from BEI Resources (National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID], NIH). Endotoxin levels in the anti-HIV-1–specific Abs preparations were determined using a commercial limulus amoebocyte lysate chromogenic endotoxin quantitation kit (Pierce/Thermo Scientific).

Cell preparation

All human blood samples were collected from donors seronegative for HIV-1 and HCV (EFS). Immature MoDCs were obtained by the differentiation of purified human blood CD14⁺ monocytes with immunomagnetic bead isolation after Ficol-Hypaque sedimentation (AutoMACS; Miltenyi Biotec). As described previously,^{26,29} autologous CD4 T lymphocytes were purified by positive selection after CD14 purification. Primary purified CD4 T lymphocytes were activated by incubation with phytohemagglutinin-A (PHA; 1 μg per million cells, 1 mg/mL) for 3 days. Cells were frozen and thawed 1 day before use.²⁶

Virus preparation

Primary HIV-1 isolates were amplified on human blood leukocytes, as described previously.²⁸ Virus stocks collected at peak virus production were concentrated 70-fold with a 100-kDa cutoff polyethersulfone filter (Centricon Plus-70 Biomax Filter; Millipore). Primary R5 HIV-1_{ind} (subtype B) was provided by S. Gartner, M. Popovic, and R. Gallo (NIH). HIV-1_{TV1} (subtype C, R5 strain) was obtained from S. Engelbrecht (NHLS, University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa). HIV-1_{CR1} (subtype B, R5 strain) was obtained from the National Institute for Biologic Standards and Control (NIBSC).

HIV-1–transfer experiments

The conditions used for MoDC infection and coculture with PHA-activated autologous CD4 T lymphocytes were similar to those described previously.²⁶ Briefly, immature MoDCs were infected with primary R5 HIV-1 at

a concentration of 500 ng/mL of viral p24 Ag. After 2 hours of incubation, the cells were washed thoroughly to remove unbound free viral particles. Next, 25 μL of HIV-1–loaded MoDCs (at 6 × 10⁶ cells/mL) were incubated with 25 μL of PHA-activated CD4 T lymphocytes at 24 × 10⁶ cells/mL and 25 μL of human mAbs (in serial 2-fold dilutions beginning from a concentration of 100 μg/mL, except for VRC01 and VRC03, for which the starting concentration was 50 μg/mL) in 96-well plates. Where indicated, 5 μM AZT (Sigma-Aldrich), a reverse transcriptase inhibitor, was added at the same time as the CD4 T lymphocytes, to prevent HIV-1 replication. The detection of viral p24 Ag in AZT-treated wells was considered to represent residual p24 detected in the absence of *de novo* virus synthesis. Unless otherwise stated, productive infection was quantified by flow cytometry based on the detection of intracellular viral p24 Ag in both cell populations after 48 hours of culture.

Kinetics of HIV-1 fusion, replication, and detection of a single cycle of HIV-1 replication in cocultured MoDCs and CD4 T lymphocytes

For studies of the kinetics of HIV-1 fusion and replication in MoDCs and autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes, we added 5 μg/mL of Fuzeeon (T20, an HIV-1 fusion inhibitor; AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) or 5 μM HIV-1 AZT at various times after infection. We added the HIV-1 protease inhibitor indinavir (IDV; AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) at a concentration of 1 μM³¹ to MoDCs at the same time as CD4 T lymphocytes for analysis of a single cycle of HIV-1 replication.

Ab neutralizing activity on purified CD4 T lymphocytes

The neutralizing activity of Abs was assessed as described previously.²² Briefly, we incubated 25 μL of primary HIV-1_{ind} isolate (concentration of 500 ng/mL of viral p24 Ag to give > 2% infected cells) for 1 hour with 25 μL of human mAbs. We then added 25 μL of PHA-stimulated CD4 T lymphocytes at 15 × 10⁶ cells/mL. After 48 hours, the percentage of infected CD4 T lymphocytes was determined by flow cytometric analysis of intracellular p24 viral Ag.

Cell staining and flow cytometry assay

Briefly, cells were labeled with Live/Dead Fixable Dead Cell Stain fluorescence kits (Invitrogen/Applied Biosystems) for 10 minutes at room temperature. After washing, a mixture of Abs directed against the human CD209, CD83, and CD3 cell-surface molecules was incubated for 10 minutes at 4°C. Cells were fixed and permeabilized with the Cytotix/Cytoperm wash kit solutions (BD Biosciences) and subjected to intracellular p24 Ag staining. The percentages of infected DC-SIGN⁺ (CD209⁺) CD3⁺ MoDCs and infected CD3⁺ DC-SIGN⁺ CD4 T lymphocytes were determined by flow cytometry. Multicolor samples were acquired with an LSRII SORP cytometer (BD Biosciences). We used cytometer setup and tracking calibration particles to ensure that the fluorescence intensity measurement was consistent in all experiments. We used a flow cytometry CompBeads kit (BD Biosciences) for compensation. Forward-angle and side-scatter light gating were used to exclude cell debris from the analysis. Forward width and forward area were used to exclude doublet cells, and dead cells were excluded with the Live/Dead Kit solution. The final analysis was performed with FACSDiva Version 6.1.2 software (BD Biosciences), which generated a graphical output.

Ab-binding detection assay

Cells were incubated with various anti-HIV-1–specific Abs (at a concentration of 100 μg/mL, except for VRC01 and VRC03, used at a concentration of 50 μg/mL) for 10 minutes at 4°C, washed with PBS, and incubated for 10 minutes at 4°C with goat F(ab')₂ fragment anti-human IgG (Fcγ)-PE (Beckman-Coulter). Cells were washed and fixed in Cytotix solution. We determined the percentage of cells positive for Ab binding by flow cytometry (LSRII SORP). In parallel, we blocked FcγRs on the surface of MoDCs by incubating MoDCs with a mixture of purified anti-FcγRI

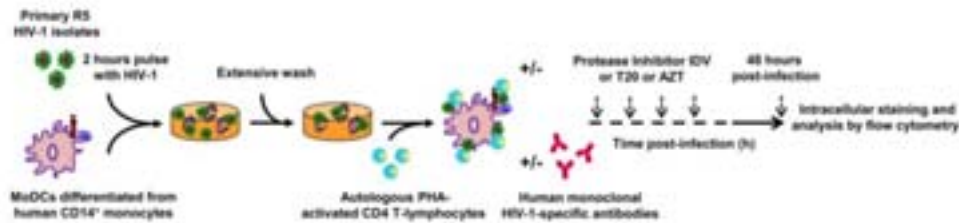


Figure 1. Schematic diagram of the HIV-1-transfer assay. Immature MoDCs were pulsed with primary RS HIV-1 isolates for 2 hours, thoroughly washed, and added to uninfected primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes. The percentage of HIV-1-infected cells in each cell population was determined on the basis of intracellular viral p24 Ag detection by flow cytometry.

(CD64, clone 10.1), anti-FcγRII (CD32, clone 3D3), and anti-FcγRIII (CD16, clone 3G8) Abs (BD Pharmingen) at 10 μg/ml, for 30 minutes at 4°C before adding Abs specific for HIV-1. The percentage of Ab binding via FcγRs on MoDCs was defined as the percentage of Ab binding to MoDCs minus the percentage of Ab binding to MoDCs treated with anti-FcγR Abs.

ELISA

We determined the amount of HIV-1 p24 Ag released into the supernatant of cocultured cell populations by ELISA (Inogenetics/Ingen).

Statistical analysis

Groups were compared by 1-way ANOVA (Kruskal-Wallis test), with *t* tests used for pairwise comparisons (Mann-Whitney test). $P < .05$ was considered statistically significant. Correlations were analyzed by calculating the Pearson correlation coefficient, with $P < .05$ considered statistically significant.

All statistical calculations were performed with Prism Version 5.04 software (GraphPad).

Results

Productive HIV-1 infection of MoDCs and CD4 T lymphocytes

We selected HIV-1-transfer conditions suitable for assessment of the early stage of HIV-1 transfer *in trans* from MoDCs to CD4 T lymphocytes (Figure 1): PHA-activated CD4 T lymphocytes and anti-HIV-1-specific Abs were added to immature MoDCs incubated for 2 hours with HIV-1. We determined HIV-1 replication after 48 hours of infection to minimize multiple cycles of reverse transcription leading to transfer *in cis* (Figure 1). At this time point, HIV-1 transfer from MoDCs to PHA-activated CD4 T lymphocytes

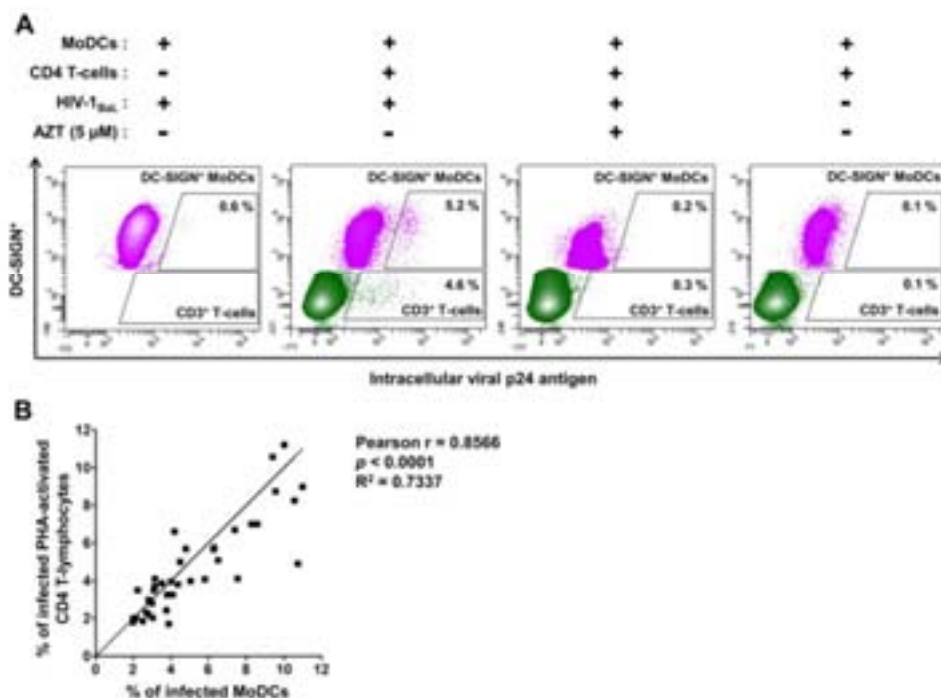


Figure 2. Detection of intracellular HIV-1 p24 Ag production in immature MoDCs and primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes. (A) Dot-plots representations of MoDCs (in pink), infected with primary HIV-1 or uninfected, and CD4 T lymphocytes (in green) in the coculture. We differentiated between MoDCs and CD4 T lymphocytes on flow cytometry by analyzing the expression of DC-SIGN⁺ (CD209⁺) and CD3⁺, respectively. The HIV-1 reverse transcriptase inhibitor AZT was added to the coculture at the same time as CD4 T lymphocytes as a negative control for HIV-1 replication. Experiments were performed in duplicate and the mean percentages of intracellular p24⁺ MoDCs or CD4 T lymphocytes are shown in the dot plot. (B) Curve for the correlation between the mean values of the percentage of infected MoDCs and infected primary PHA-activated CD4 T lymphocytes in coculture conditions. The Pearson correlation coefficient and its significance are shown, $n = 38$ experiments performed with cells from different healthy blood donors for panels A and B.

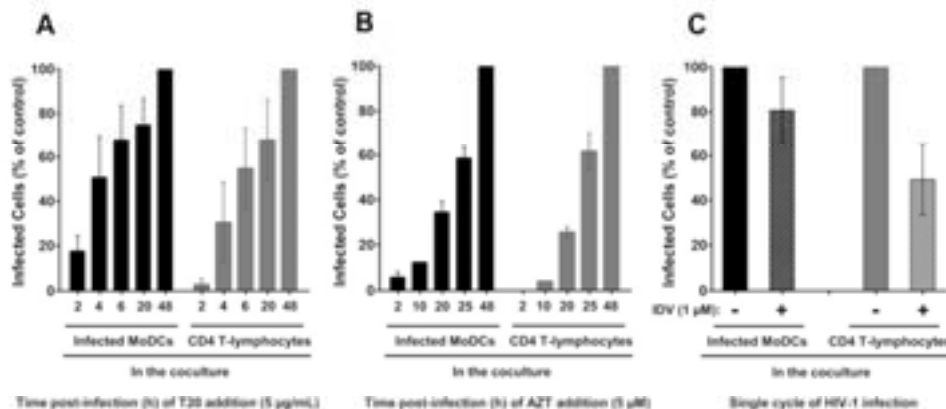


Figure 3. Kinetics of HIV-1 fusion and replication in cocultured MoDCs and primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes. We added 5 μ M T20 (HIV-1 fusion inhibitor; A) or 5 μ M AZT (reverse transcriptase inhibitor; B) to HIV-1–loaded MoDCs/CD4 T lymphocytes cocultures at various times. Infection was assessed 48 hours after infection with HIV-1₆₆₄₂, and the percentage of infection compared with control (without T20 or AZT) was calculated. Data are expressed as means \pm SD for $n = 6$ (A) or $n = 4$ (B) independent experiments performed with cells from different healthy blood donors. (C) Percentages of infection in each cocultured cell population in the presence of the HIV-1 protease inhibitor IDV compared with control cells (in the absence of IDV). Data are expressed as the means \pm SD for $n = 14$ independent experiments performed with cells from different healthy blood donors.

was efficient (4.6% of CD3⁺ T lymphocytes were p24⁺; Figure 2A). In addition, infected immature MoDCs were detected, because 5.2% of these cells were p24⁺ (Figure 2A). This infection corresponded to newly synthesized virions, because the low percentages of p24⁺ cells were detected in the presence of the reverse transcriptase inhibitor AZT (Figure 2A) and were similar to uninfected MoDCs cocultured with CD4 T lymphocytes (Figure 2A). In the absence of CD4 T lymphocytes, only a few (0.6%) immature DC-SIGN⁺ MoDCs displayed HIV-1 replication after 48 hours (Figure 2A).

Efficient HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes was observed repeatedly ($n = 38$). The percentage of HIV-1 replication in CD4 T lymphocytes was correlated with that in MoDCs (Figure 2B), suggesting a high degree of cooperation between MoDCs and CD4 T lymphocytes to promote HIV-1 replication in these 2 cell types.

Kinetics of HIV-1 fusion and replication

We analyzed the kinetics of HIV-1 membrane fusion in coculture conditions by adding a fusion inhibitor (T20) at various time points after infection (Figure 3A). When T20 was added to HIV-1–loaded MoDCs at the same time as CD4 T lymphocytes, approximately 20% of the MoDCs were found to be positive for intracellular p24 Ag 48 hours later compared with control MoDCs in the absence of T20. Therefore, approximately 80% of the HIV-1 particles had yet to fuse with immature MoDCs after 2 hours of incubation (Figure 3A) and were still accessible to HIV-1–specific Abs. Moreover, at this time point, T20 almost completely inhibited HIV-1 transfer to primary CD4 T lymphocytes, demonstrating the requirement for fusion in HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes, as described previously (Figure 3A).^{33,34}

We also investigated the kinetics of HIV-1 reverse transcription by adding the reverse transcriptase inhibitor AZT at various time points after infection. The reverse transcription profiles of MoDCs and CD4 T lymphocytes were similar in coculture conditions (Figure 3B). Indeed, 40% of MoDCs and 30% of CD4 T lymphocytes were already infected when AZT was added 20 hours after infection compared with control cells in the absence of AZT. The reverse transcription in MoDCs alone (in the absence of CD4 T lymphocytes) began after 48 hours and the first round of viral

replication was not detected until 72 hours (data not shown).^{28,29} Therefore, an increased rate of reverse transcription was observed in MoDCs when cocultured with CD4 T lymphocytes. This increase of reverse transcription rate may account for the higher percentage of HIV-1 p24⁺ MoDCs observed when they were cocultured with CD4 T lymphocytes.

Single cycle of HIV-1 infection in MoDCs and CD4 T lymphocytes in coculture

We investigated whether the HIV-1 replication in MoDCs and CD4 T lymphocytes corresponded to a single cycle of HIV-1 infection after 48 hours of incubation by adding a protease inhibitor, IDV. IDV prevent new cycles of infection by blocking final assembly and maturation of newly synthesized virions. In the presence of IDV, infected MoDCs correspond to 80% of control infected MoDCs (in the absence of IDV; Figure 3C). The HIV-1 replication detected in these cells after 48 hours was therefore due essentially to a single cycle of infection. Conversely, approximately half of the lymphocyte population was found to be positive for intracellular p24 Ag production in the presence of IDV (Figure 3C), indicating the occurrence of a new cycle of HIV-1 replication in CD4 T lymphocytes. Therefore, approximately half of the HIV-1 replication detected in these lymphocytes corresponds to HIV-1 transfer *in trans*, the other half corresponding to HIV-1 transfer *in cis*. However, further studies are required to determine whether these new infectious particles were produced by MoDCs or CD4 T lymphocytes. Coculture for 24 hours was not sufficient for the analysis of p24 in HIV-1–infected MoDCs and CD4 T lymphocytes by flow cytometry (data not shown). We therefore chose to use an incubation period of 48 hours, corresponding mainly to transfer *in trans* from DCs to CD4 T lymphocytes, for analysis of the inhibition of HIV-1 transfer by Abs.

Ab-mediated inhibition of HIV-1 transfer

We analyzed the inhibition of HIV-1 transfer from immature DCs to CD4 T lymphocytes by Abs using a panel of specific anti-HIV-1 Abs at various concentrations, and the concentration of Ab resulting in a 70% decrease in the percentage of infected cells (inhibitory concentration 70, IC₇₀) values were calculated (Figure 4

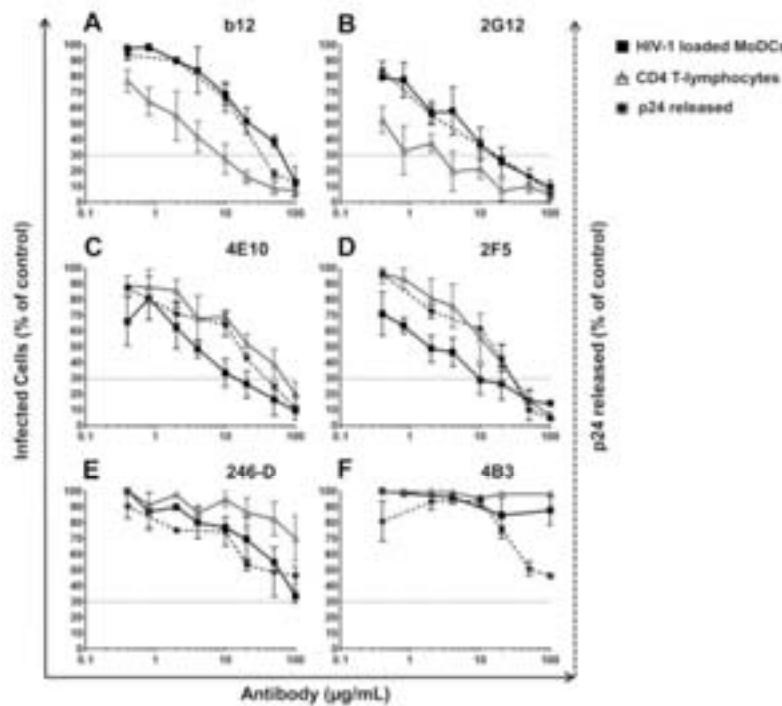


Figure 4. Inhibition of HIV-1 trans-infection by various HIV-1-specific Abs. HIV-1-specific Abs were added 2 hours after the infection of immature MoDCs at the same time as PHA-activated CD4 T lymphocytes. After 48 hours of culture, infection was determined by the detection of HIV-1 intracellular p24 Ag production by flow cytometry or by the detection of viral p24 Ag released into the supernatant by ELISA. Percentages of infected MoDCs (black squares) or CD4 T lymphocytes (gray triangles) after coculture in the presence of a panel of different anti-HIV-1-specific Abs: anti-gp120 NAb 512 (A) and 2G12 (B); anti-gp41 NAb 4E10 (C) and 2F5 (D); and NNAb 246-D (E) and 4B3 (F). The percentage of viral p24 released into the supernatant of the coculture is indicated by black dots and asterisks. Dashed lines correspond to the IC₅₀ concentrations of Abs. The curve corresponds to the means ± SD of at least 4 independent experiments performed with cells from 4 different healthy blood donors.

and Table 1). Indeed, because 20% of HIV-1 had already fused with MoDCs before the addition of Abs (Figure 3A), IC₅₀ would have been too stringent. In addition, IC₅₀ was not very reproducible because of the intrinsic variability among primary HIV-1 isolates infecting primary human cells. We found that the 6 NAb (anti-gp120: 2G12, b12, VRC01, and VRC03 and anti-gp41: 2F5 and 4E10) effectively prevented HIV-1 transfer from MoDCs to

PHA-activated CD4 T lymphocytes (Figure 4A-D and Table 1). These NAb had IC₅₀ values between 4 and 47 µg/mL for HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes (Table 1), whereas the NNAb 5F3 and 1570-D and the NNAb Fcγ-mediated inhibitory Abs 246-D and 4B3 did not prevent HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes (Figure 4E-F and Table 1). We further analyzed the inhibition by Abs of HIV-1 transfer *in trans* only by adding the protease inhibitor

Table 1. Inhibition of cell-to-cell transfer by mAbs and MoDC maturation

Monoclonal IgG	HIV-1 [±]		Statistical analysis	MoDC maturation
	T cells	MoDCs		
NAb				
Anti-gp120				
2G12	4 ± 3*	19 ± 13*	P = .0021 (n = 10)	- (n = 5)
b12	11 ± 5*	48 ± 23†	P < .0001 (n = 14)	++ (n = 7)
VRC01	7 ± 5*	98 ± 56§	P = .0159 (n = 5)	+ (n = 4)
VRC03	9 ± 5*	91 ± 57§	P = .0286 (n = 4)	+ (n = 3)
Anti-gp41				
2F5	27 ± 18†	13 ± 9*	P = .0262 (n = 12)	++ (n = 6)
4E10	47 ± 28‡	19 ± 11*	P = .0037 (n = 16)	+++ (n = 9)
NNAb				
4B3	> 100%¶	> 100%¶	P = .0159 (n = 6)	- (n = 5)
246-D	> 100%¶	75 ± 25§	P < .0001 (n = 9)	++ (n = 6)
5F3	> 100%¶	> 100%¶	P = .4000 (n = 3)	+ (n = 2)
1570-D	> 100%¶	> 100%¶	P = .8857 (n = 4)	- (n = 2)

The inhibitory activity of mAbs added at different concentrations was analyzed in the HIV-1-transfer assay. The concentration of Ab resulting in IC₅₀ was calculated in parallel for HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes and for HIV-1 replication in MoDCs. IC₅₀ values are expressed as means ± SD. Statistical analysis of pairwise comparisons was based on *t* tests (Mann-Whitney test), with P < .05 considered significant. MoDC maturation is presented as the fold increase (F.I.), calculated as the percentage of CD83⁺ DC-SIGN⁺ MoDCs in the presence of Abs divided by the percentage of CD83⁺ DC-SIGN⁺ control MoDCs in the absence of Abs.

+++ indicates > 3 F.I.; ++, 2.1-3 F.I.; +, 1.2-2 F.I.; and -, < 1.2 F.I.

* < 20 µg/mL.
† 20-40 µg/mL.
‡ 40-60 µg/mL.
§ 60-100 µg/mL.
¶ > 100 µg/mL.

IDV to the coculture. Inhibition efficiency was similar in the presence and absence of IDV (supplemental Figure 1C-D, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article), demonstrating the capacity of NABs to inhibit *trans*-infection. Moreover, this inhibition was maintained over a period of 5 days, indicating a subsequent inhibition by Abs of transfer *in cis* (data not shown). This Ab-mediated inhibition of HIV-1 transfer was observed after the infection of MoDCs with subtype C HIV-1_{CRF01_AG} and subtype B HIV-1_{CRF02_AG} viruses in addition to HIV-1_{Lab} (data not shown).

In addition to inhibiting HIV-1 transfer, NABs also inhibited MoDC infection in these coculture conditions despite the loading of MoDCs with HIV-1 2 hours before the addition of Abs (Figure 4A-D, supplemental Figure 1A-B, and Table 1). Moreover, slightly lower levels of HIV-1 replication in MoDCs were detected in the presence of NNAb 246-D (Figure 4E and Table 1), although no inhibition of HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes was observed. For NABs directed against gp120, the inhibition of HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes was more efficient than the inhibition of HIV-1 replication in MoDCs (Figure 4A-B, supplemental Figure 1A-C, and Table 1). In contrast, for the anti-gp41 NABs and 2 NNABs (246-D and 4B3), HIV-1 replication in MoDCs was inhibited more strongly than HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes (Figure 4C-F, supplemental Figure 1B-D, and Table 1). These differences were observed reproducibly in at least 4 independent experiments with cells from different healthy blood donors, suggesting that Ab function may depend on the glycoprotein subunit targeted. Indeed, the NABs 4E10 and 2F5 have been shown to be active even after CD4/CCR5 engagement,³⁵ whereas anti-gp120 NABs epitopes may have limited access to HIV already bound to MoDCs.

We also analyzed viral release into the supernatant. Similar curves were obtained for the inhibition of HIV-1 transfer and the inhibition of p24 release into the supernatant, thus confirming that overall productive infection was inhibited by NABs (Figure 4A-D). The amount of viral p24 Ag released into the supernatant was also approximately 50% lower in the presence of the NNABs 246-D and 4B3 (Figure 4E-F). Our results show that NABs both efficiently inhibit HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes *in trans* and *in cis* and inhibit the infection of MoDCs.

IgG-mediated inhibition of HIV-1 replication in MoDCs is correlated with the maturation status of these cells

DC maturation decreases susceptibility to HIV-1 R5 infection.²⁶ We therefore assessed the capacity of Abs to induce MoDC maturation. The expression of the DC maturation marker CD83 on the surface of infected MoDCs was determined in the coculture with various concentrations of Abs and compared with MoDC maturation in the absence of Abs (Figure 5A and Table 1). The anti-gp41 NABs 4E10 and 2F5 induced a high percentage of mature MoDCs (50% and 42%, respectively, Figure 5A and Table 1). DC maturation was slightly lower in the presence of b12 and no CD83 expression was detected with 2G12, even when present at a concentration of 100 µg/mL (Table 1). The NNABs 246-D and 5F3 induced MoDC maturation, whereas 4B3 and 1570-D did not increase the level of CD83 expression on DCs (Table 1). This maturation could not be because of the presence of endotoxins because endotoxin levels were found to be very low (between 0.0003 and 0.196 EU) at 100 µg/mL of Abs, the highest concentration used. In addition, DC maturation was inversely correlated with the relative percentage of infected MoDCs (Figure 6). MoDC infection did not induce MoDC maturation in the absence of CD4

T lymphocytes, and the 4E10 Ab alone had minimal effects on the maturation process (Figure 7). Efficient MoDC maturation was detected in the context of coculture with CD4 T lymphocytes in the presence of the 4E10 Ab independently of viral replication ($P > .05$ by *t* tests; Figure 7). No MoDC maturation was observed after incubation with purified polyclonal IgG from HIV-infected or HIV-negative subjects or with anti-dengue mAb (DEN-3; data not shown). Therefore, the MoDC maturation observed in the context of coculture was Ab dependent.

Binding of Abs to FcγRs on the surface of MoDCs

We demonstrated previously the involvement of Fcγ receptors (FcγRs) in the mechanism of HIV-1 inhibition by NABs and NNABs in MoDCs.^{26,30} In the present study, we investigated the mechanism of MoDC maturation by specific Abs against HIV-1 by analyzing the capacity of these Abs to bind to FcγRs present on the MoDC surface. NABs 4E10 and 2F5 bound efficiently to the surface of MoDCs with approximately 76% and 62% Ab-positive cells, respectively. The NNABs 246-D and 4B3 bound MoDCs, giving 49% and 27% positive cells, respectively. Ab 2G12 bound MoDCs only weakly, with approximately 18% positive MoDCs (Figure 5B). We investigated whether this binding was mediated by the Fc portions of these IgGs by blocking FcγRs with a mixture of Abs directed against FcγRI, FcγRII, and FcγRIII before adding specific Abs against HIV-1. We found that competition with anti-FcγRs Abs had no impact on NAB 2G12 binding to MoDCs, whereas the binding of the NNABs 246-D and 4B3 to MoDCs decreased to 22% and 17%, respectively, after FcγRs blockade. The presence of anti-FcγR Abs also decreased the binding capacities of the NABs 4E10 and 2F5 to MoDCs, by 17% and 25%, respectively, but 59% and 37% of MoDCs, respectively, remained positive despite the addition of anti-FcγRs Abs (Figure 5B). Therefore, the NABs 4E10 and 2F5 bind FcγRs and other ligands on the surface of MoDCs. We then investigated the correlation between Ab binding and MoDC maturation. We found a strong association between the total binding capacity (Figure 5C) or FcγR-specific binding capacity (Figure 5D) of the various HIV-1-specific Abs and MoDC maturation. We therefore suggest that the binding of Abs to MoDCs induces the maturation of these cells, resulting in lower levels of HIV-1 replication.

Comparison between Ab-mediated inhibition of cell-to-cell HIV-1 transfer and conventional neutralization

The efficacy with which Abs inhibited HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes was compared with Ab-mediated inhibition in a conventional neutralization assay with cell-free viral particles infecting CD4 T lymphocytes (supplemental Figure 2). NABs displayed similar levels of inhibition in both assays and the IC₅₀ values were in the same range, indicating that inhibition of HIV-1 transfer by Abs is almost as efficient as inhibition of HIV-1 free virus particles. b12 inhibited free virus particles slightly more efficiently, and 2G12 inhibited HIV-1 cell-to-cell transmission better than it neutralized cell-free virus (supplemental Figure 2). Because only a few MoDCs were infected after 48 hours in the absence of CD4 T lymphocytes (Figure 2A), we did not assess the inhibitory activity of Abs in MoDCs alone.

Discussion

Immature DCs have been reported to capture virus and to transfer it efficiently to neighboring CD4 target cells through the formation of

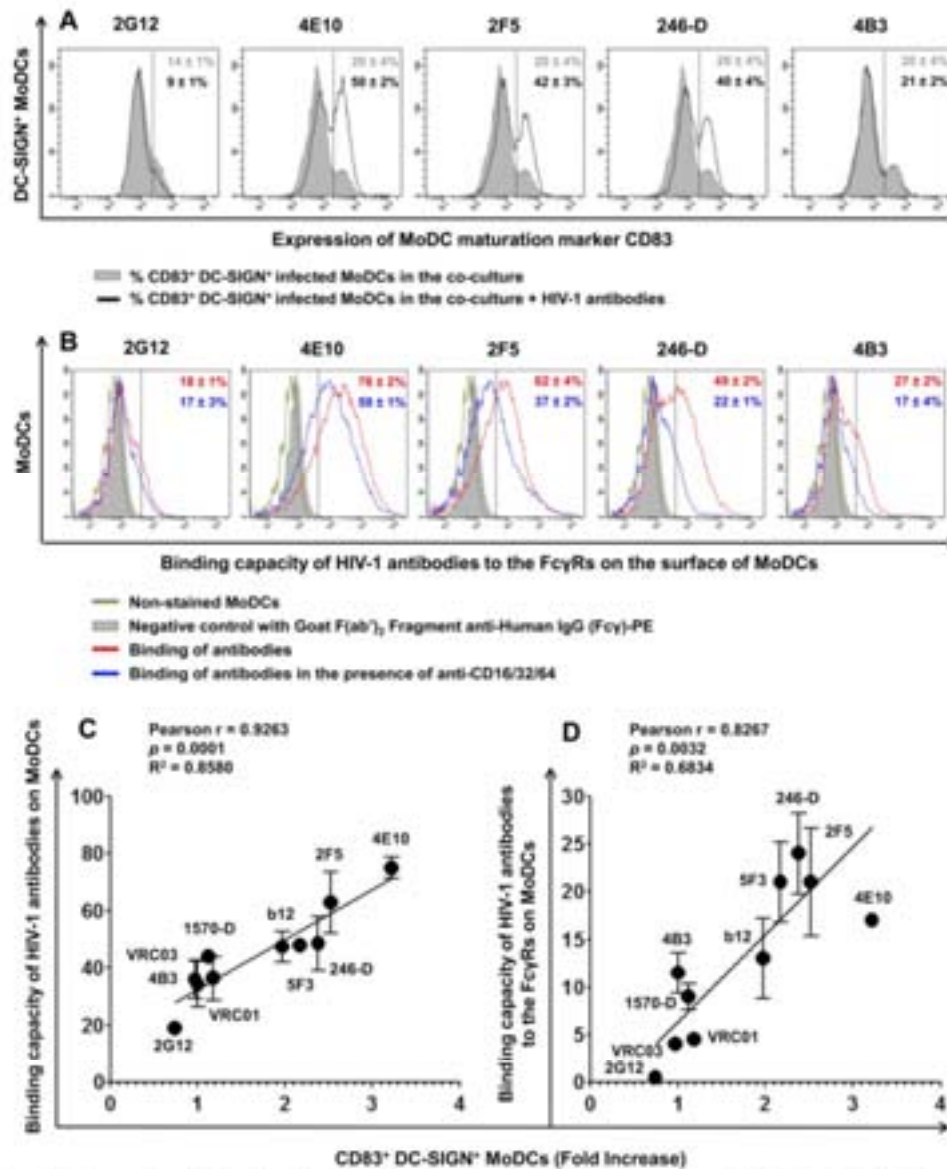
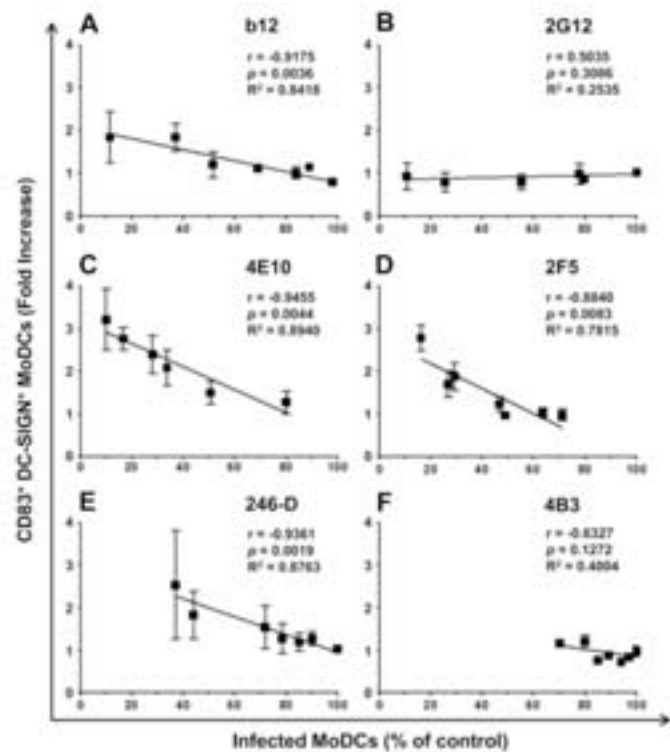


Figure 5. MoDC maturation, capacity of HIV-1 Abs to bind MoDCs, and their correlation. (A) The percentage of CD83⁺ DC-SIGN⁺ MoDCs in the coculture was determined in the presence or absence of HIV-1-specific Abs (100 μ g/mL) after 48 hours of infection. All experiments were performed at least 5 times with cells from different healthy blood donors. Representative data are shown and are expressed as means \pm SD. (B) The capacity of various anti-HIV-1 Abs to bind MoDCs was determined (red curve). Fc γ Rs were blocked by adding 10 μ g/mL of anti-Fc γ R1 (CD64), anti-Fc γ R2 (CD32), and anti-Fc γ R3 (CD16) to MoDCs for 30 minutes before adding the various anti-HIV-1 Abs (2G12, 4E10, 2F5, 246-D, and 4B3) at a concentration of 100 μ g/mL (blue curve). The capacity of Abs to bind to Fc γ Rs corresponds to the difference between the capacity of Abs to bind MoDCs (red value) and the capacity of Abs to bind MoDCs in the presence of anti-Fc γ R Abs (blue value). Representative data are shown and are expressed as means \pm SD. The correlation between the capacity of anti-HIV-1 Abs (at a concentration of 100 μ g/mL, except for VRC01 and VRC03, which are 50 μ g/mL) to bind to the surface of MoDCs (C) or to Fc γ Rs (D) and MoDC maturation (fold increase in CD83⁺ DC-SIGN⁺ MoDCs) was analyzed. Data are the means \pm SD of 2 independent experiments performed with cells from 2 healthy blood donors. Correlations were analyzed by calculating the Pearson correlation coefficient, with $P < .05$ considered significant.

virological synapses.^{2,16,17} It has been suggested that this mode of cell-to-cell spread of HIV-1 is extremely efficient, allowing the rapid dissemination of the virus in the body.¹ It is therefore essential to determine whether HIV-1-specific Abs block HIV-1 transfer, particularly transfer *in trans*, which is responsible for the initial transmission of the virus to CD4 T lymphocytes at the mucosal site.

We developed an HIV-1-transfer assay for analyzing early HIV-1 replication in immature MoDCs and CD4 T lymphocytes. With the protease inhibitor indinavir, we demonstrated that 48 hours of incubation corresponded to a single cycle of HIV-1 infection in MoDCs. We therefore used these conditions to assess the capacity of HIV-1-specific Abs to inhibit HIV-1 transfer *in trans* to CD4 T lymphocytes. We demonstrated that NAbs efficiently inhibited

Figure 6. Correlation between the percentage of infected MoDCs and the percentage of mature MoDCs in the presence of HIV-1-specific Abs. Curve for the correlation between the percentage of infected MoDCs (with respect to control) and the fold increase in the percentage of CD83⁺ DC-SIGN⁺ MoDCs for each Ab concentration (100 μ g/mL and serial 2-fold dilutions, as in Figure 4). Anti-gp120 NAbs b12 (A) and 2G12 (B); anti-gp41 NAbs 4E10 (C) and 2F5 (D); and NNABs 246-D (E) and 4B3 (F). Data are the means \pm SD of at least 5 independent experiments performed with cells from different healthy blood donors. Correlations were analyzed by calculating the Pearson correlation coefficient, with $P < .05$ considered significant.



this transfer; the cell-to-cell spread of HIV is therefore susceptible to the inhibitory properties of Abs. An interesting trend was observed for 2G12, which inhibited HIV-1 cell-to-cell transmission slightly more efficiently than it neutralized cell-free virus. Indeed, 2G12 recognizes glycans with high mannose content on the surface of the viral envelope gp120.⁷⁷ These glycans are also recognized by DC-SIGN and thus 2G12 interferes with the viral envelope gp120/DC-SIGN interaction.⁷⁷ Because DC-SIGN is thought to play a critical role in HIV transfer,²⁴ 2G12 may have an additional effect by blocking the DC-SIGN/CD4 interaction.

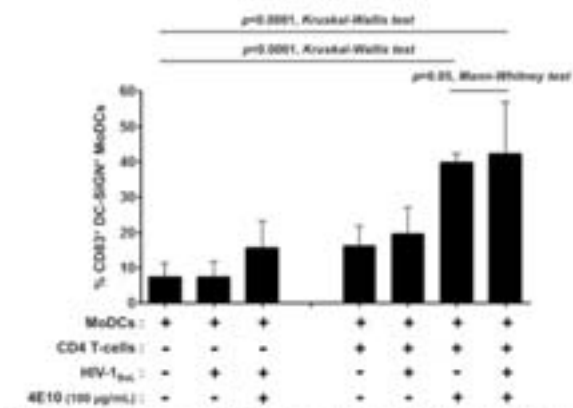


Figure 7. Induction of MoDC maturation by the anti-HIV-1 neutralizing mAb 4E10 in various culture conditions. The percentage of CD83⁺ DC-SIGN⁺ MoDCs was determined after 48 hours of culture in the presence or absence of virus, CD4 T lymphocytes, or Abs. Data are the means \pm SD of at least 6 experiments performed with cells from different healthy blood donors. Groups were compared by 1-way ANOVA (Kruskal-Wallis test), and pairwise comparisons were based on t tests (Mann-Whitney test), with $P < .05$ considered significant.

Fluorescence microscopy and electron tomography have shown that inhibitors have access to the preformed virological synapses and can interfere with HIV-1 cell-to-cell infection.⁷⁴ Consequently, the HIV-1 bound to the DC surface remains accessible to neutralizing mAbs. Moreover, the inhibitory effects of NABs on HIV-1 transfer were of similar strength to those detected when free HIV-1 particles infect CD4 T lymphocytes (supplemental Figure 2) or in more classic neutralization assays involving PBMCs.^{28,30} In neutralizing conditions, PBMCs were first incubated with free virus particles, and then cultured to confluence. HIV-1 transfer from cell-to-cell probably occurs during this incubation phase, and Abs would also need to inhibit this cell-to-cell transmission. This may account for the lower overall inhibitory activity of NABs in conventional primary PBMCs assays than in a single-cycle, T-cell line-based neutralization assay.³⁰

Several studies have investigated the inhibition of HIV-1 transfer by Abs and have reported conflicting results, some showing HIV-1 transfer to be resistant to entry inhibitors or NABs,^{8,25,39-43} and others reporting efficient inhibition of HIV-1 replication.^{12,18,27,28,33,34,44} All of these studies analyzed either the early step of viral entry or HIV-1 release into the supernatant; none considered HIV-1 replication in immature MoDCs. We show herein that immature MoDCs play a major role in both HIV-1 production and HIV-1 inhibition by Abs. A higher percentage of infected MoDCs was repeatedly observed 48 hours after infection after incubation in the presence of autologous activated CD4 T lymphocytes, as described previously.²⁶ This higher rate of HIV-1 replication in DCs after interaction with CD4 T lymphocytes affects the NAB-mediated inhibition.

In addition to inhibiting HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes, NABs decreased HIV-1 replication in MoDCs. By dissecting the early steps of HIV-1 replication during coculture, we showed that

more than 80% of the virus had not yet fused with immature MoDCs 2 hours after infection. This suggests that HIV-1 bound to the surface of MoDCs remains accessible to anti-HIV-1 Abs. Moreover, some Abs, such as NNAb 246-D, did not affect HIV-1 transfer from infected MoDCs to CD4 T lymphocytes, but significantly decreased the percentage of infected MoDCs. Furthermore, the inhibition of HIV-1 replication in MoDCs was correlated with the expression of the DC maturation marker CD83.

In the context of DC-T-cell cross-talk, HIV/Abs immune complexes have been shown to be more efficient than virus alone for triggering Ag presentation by DCs.⁴⁵ FcγR engagement on DCs induces maturation.⁴⁵ We therefore assessed the capacity of Ab to bind receptors on the surface of DCs and found that some Abs, such as the NAbs 4E10 and 2F5, bound efficiently to MoDCs. This binding partially involved FcγRs, because lower levels of Ab binding were observed in the presence of anti-FcγR Abs. However, some FcγR-unrelated binding was also observed. This additional binding capacity of the NAbs 4E10 and 2F5 may be because of their polyspecific autoantibody properties⁴⁶ because they bind other proteins such as phospholipids.⁴⁷

Ab binding to FcγRs on the surface of MoDC was correlated with DC maturation (Figure 5C-D). Abs may therefore be involved in an additional mechanism leading to DC maturation that might protect DCs against infection with R5 viruses and contribute to the efficient induction of HIV-1-specific immune responses. This maturation may therefore be highly valuable in the context of a protective prophylactic vaccine, although it might lead to tolerance in the cases of chronic infections.⁴⁵ For Ab 2G12, the binding to MoDCs was very low. We proposed that this low binding may be because of the very special dimeric form of this IgG,⁴⁸ therefore minimizing the capacity of this Ab to bind to FcγRs and consequently preventing MoDC maturation. Our results suggest that, in the context of DC-T-cell coculture, the inhibition of DCs infection observed with some Abs involves at least 2 different mechanisms: the neutralization of virus particles still attached to the MoDC surface by the Fab part of the IgG and the maturation of MoDCs through IgG-FcγRs or other Ab-cell interactions.

HIV-1 replication is highly restricted in DCs. It has been suggested that SAMHD1 limits HIV-1 replication by decreasing dNTP pools in myeloid cells.^{49,50} Mature DCs are not very susceptible to R5 viral replication; the viral life cycle is blocked shortly after entry⁷ and the levels of the APOBEC3G restriction factor are high.³⁶ In our experimental conditions for HIV-1 transfer, HIV-1 replication in DCs was strongly modulated, increasing on coculture with CD4 T lymphocytes and decreasing after the addition of HIV-1-specific Abs. Further investigations are required to determine the mechanisms

involved in these modulations, which may have a major impact on HIV replication and dissemination in vivo.

Although favorable levels of HIV-1 replication were observed in the conditions used for the coculture of immature MoDCs and primary CD4 T lymphocytes in the present study, well-known NAbs were able to inhibit HIV-1 transfer and replication efficiently. These results are extremely encouraging and provide further evidence of the need for any vaccine to induce the production of such Abs directly at the mucosal site to prevent the early dissemination of HIV-1 after its sexual transmission. Moreover, although NNAbs inhibited HIV-1 transfer from DCs to CD4 T lymphocytes only inefficiently, some NNAbs decreased HIV-1 replication in MoDCs significantly, suggesting a possible contribution to protection against HIV-1.

Acknowledgments

This study was supported by EuroNeut41 (FP7-HEALTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Sidaction, Dormeur Investment Service Ltd, and Agence Nationale de Recherche sur le Sida grants. B.S. was supported by a EuroNeut41 grant and K.X. obtained a doctoral scholarship from EuroPrise.

Authorship

Contribution: B.S. and K.X. performed the experiments; B.S., A.L., M.P., V.H., and C.M. analyzed the data; B.S., A.L., M.E.B., G.L., S.S., T.D., A.P., M.L., V.H., and C.M. contributed reagents, materials, and analysis tools; and B.S., V.H. and C.M. conceived the study, designed the experiments, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for K.X. is State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Beijing, China. The current affiliation for V.H. is Laboratory Science Department, Hematology and Flow Department, Covance CLS SA, Geneva, Switzerland.

Correspondence: Dr Vincent Holl, Laboratory Science Department, Hematology and Flow Department, Covance CLS SA, 7 Rue Moise-Marcinhes, CH-1217 Meyrin, Geneva, Switzerland; e-mail: vincent.holl@covance.com; or Dr Christiane Moog, Inserm U748, Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France; e-mail: c.moog@unistra.fr.

References

- Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(1):25-34.
- Piquet V, Steinman RM. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol*. 2007;28(11):500-510.
- Hladik F, Sakchalathorn P, Balwazer L, et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*. 2007;26(2):257-270.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252.
- Spica AJ, Marx PA, Patterson BK, et al. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med*. 1996;183(1):215-225.
- Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol*. 2000;74(13):6087-6095.
- Gronth-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Padon W, Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate macrophage-tropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol*. 1998;72(4):2733-2737.
- Ganesh L, Leung K, Lore K, et al. Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. *J Virol*. 2004;78(21):11980-11987.
- Peresin M, Holl V, Schmidt S, et al. HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies. *J Virol*. 2011;85(2):1077-1085.
- Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*. 1992;257(5068):383-387.
- Piquet V, Sattertau Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest*. 2004;114(5):605-610.
- Cavrois M, Neideman J, Kriebel JF, Greene WC. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog*. 2007;3(1):e4.
- Felts RL, Narayan K, Estes JD, et al. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse

- between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(30):13336-13341.
14. Nikolic DS, Lehmann M, Felts RL, et al. HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood*. 2011;118(18):4841-4852.
 15. Moris A, Pejt A, Blanchet F, Gulvel-Berhassine F, Salcedo M, Schwartz O. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*. 2006;108(5):1643-1651.
 16. Sattentau QJ. Cell-to-cell spread of retroviruses. *Virology*. 2010;2(6):1306-1321.
 17. Cavrois M, Neideman J, Greene WC. The Achilles heel of the Trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(6):e1000051.
 18. Yu HJ, Reuter MA, McDonald D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2008;4(8):e1000134.
 19. Turville SG, Santos JJ, Frank I, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103(6):2170-2179.
 20. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):859-868.
 21. McDonald D, Wu L, Borhis SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 2003;300(5623):1295-1297.
 22. Jolly C, Sattentau QJ. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic*. 2004;5(9):643-650.
 23. Wiley RD, Gummuru S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):738-743.
 24. Geijtenbeek TB, Keon DS, Toranuma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-597.
 25. van Montfort T, Nabatov AA, Geijtenbeek TB, Polfakis G, Paxton WA. Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178(5):3177-3185.
 26. Holl V, Xu K, Peressin M, et al. Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. *J Virol*. 2010;84(9):4172-4182.
 27. Frankel SS, Steinman RM, Michael NL, et al. Neutralizing monoclonal antibodies block human immunodeficiency virus type 1 infection of dendritic cells and transmission to T cells. *J Virol*. 1996;70(12):9788-9794.
 28. Sagar M, Akiyama H, Elamad B, Ramirez N, Freitas I, Gummuru S. Transmembrane domain membrane proximal external region but not surface unit-directed broadly neutralizing HIV-1 antibodies can restrict dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. *J Infect Dis*. 2012;205(9):1248-1257.
 29. Holl V, Peressin M, Schmidt S, et al. Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. *Blood*. 2006;107(11):4466-4474.
 30. Holl V, Peressin M, Decoville T, et al. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J Virol*. 2006;80(12):6177-6181.
 31. Mascola JR, Loutser MK, Winter C, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *J Virol*. 2002;76(10):4810-4821.
 32. Holl V, Hemmerler S, Burrel R, et al. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2004;173(10):6274-6283.
 33. Ketas TJ, Frank I, Klasse PJ, et al. Human immunodeficiency virus type 1 attachment, coreceptor, and fusion inhibitors are active against both direct and trans infection of primary cells. *J Virol*. 2003;77(4):2762-2767.
 34. Martin N, Wleclch S, Jolly C, Briggs JA, Vaux D, Sattentau QJ. Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition. *J Virol*. 2010;84(7):3516-3527.
 35. Crooks ET, Moore PL, Richman D, et al. Characterizing anti-HIV monoclonal antibodies and immune sera by defining the mechanism of neutralization. *Hum Antibodies*. 2005;14(3-4):101-113.
 36. Pion M, Granelli-Piperno A, Margeat E, et al. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2006;203(13):2897-2899.
 37. Binley JM, Ngo-Abdalla S, Moore P, et al. Inhibition of HIV Env binding to cellular receptors by monoclonal antibody 2G12 as probed by Fc-tagged gp120. *Retrovirology*. 2006;3:39.
 38. Fanyó EM, Heath A, Dipinseri S, et al. International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeuNet report. *PLoS One*. 2009;4(2):e4505.
 39. Chen P, Hubner W, Spinelli MA, Chen BK. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol*. 2007;81(22):12562-12565.
 40. Sanchez-Palomino S, Massanella M, Carrillo J, et al. A cell-to-cell HIV transfer assay identifies humoral responses with broad neutralization activity. *Vaccine*. 2011;29(32):5250-5259.
 41. Hubner W, McNemey GP, Chen P, et al. Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science*. 2009;323(5922):1743-1747.
 42. Dale BM, McNemey GP, Thompson DL, et al. Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion. *Cell Host Microbe*. 2011;10(8):551-562.
 43. Yee M, Konopka K, Balzarini J, Duzgunes N. Inhibition of HIV-1 env-mediated cell-cell fusion by lectins, peptide T-20, and neutralizing antibodies. *Open Virol J*. 2011;5:44-51.
 44. Massanella M, Puigdomenech I, Cabrera C, et al. Anti-gp41 antibodies fail to block early events of virological synapses but inhibit HIV spread between T cells. *AIDS*. 2009;23(2):183-188.
 45. Regnaud A, Lanke D, Lacabanne V, et al. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. 1999;189(2):371-380.
 46. Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, et al. Cardiopin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*. 2006;308(5730):1906-1908.
 47. Alam SM, McAdams M, Boren D, et al. The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. *J Immunol*. 2007;178(7):4424-4435.
 48. West AP Jr, Galimidi RP, Foglesong CP, et al. Design and expression of a dimeric form of human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 with increased neutralization potency. *J Virol*. 2009;83(1):98-104.
 49. Lathouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012;13(3):223-228.
 50. Laguerre N, Sobhan B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654-657.

Supplemental Figures

Figure Legends:

Figure S1. Inhibition of HIV-1 *trans*-infection by HIV-1-specific antibodies in the presence or absence of protease inhibitor. The protease inhibitor indinavir IDV (1 μ M) was added at the same time as monoclonal anti-HIV-1 NAbs b12 (A, C) and 4E10 (B, D). After 48 hours of coculture, the percentage of infected CD4 T-lymphocytes (C, D) or infected MoDCs (A, B) was determined by the detection of HIV-1 intracellular p24 antigen by flow cytometry, and compared to control cells without Abs. Data are means \pm standard deviation (SD) of at least 4 independent experiments with cells from different healthy blood donors.

Figure S2. Comparison of the inhibition by anti-HIV-1 antibodies of cell-to-cell transfer and conventional neutralization assays with free viral particles. The capacity of NAbs to inhibit cell-to-cell transfer (transfer protocol, n is the number of independent experiments performed with cells from different healthy blood donors in Table 1) and cell-free HIV-1 particles (conventional neutralization protocol, $n=3$ independent experiments performed with cells from 3 different healthy blood donors) was analyzed in CD4 T-lymphocytes. The inhibitory concentration 70 (IC₇₀: concentration of Abs able to inhibit by 70% the percentage of intracellular p24 positive cells) was calculated for each antibody. Data, expressed as means \pm SD. Pairwise comparisons were made by using the Mann-Whitney t tests, with $p<0.05$ considered significant.

Figures:

Figure S1

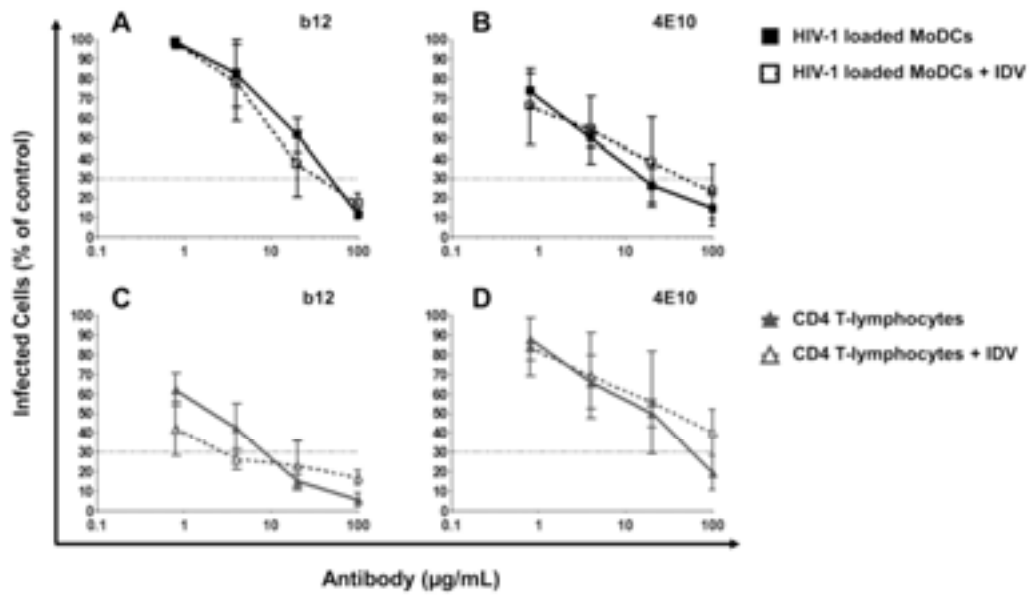
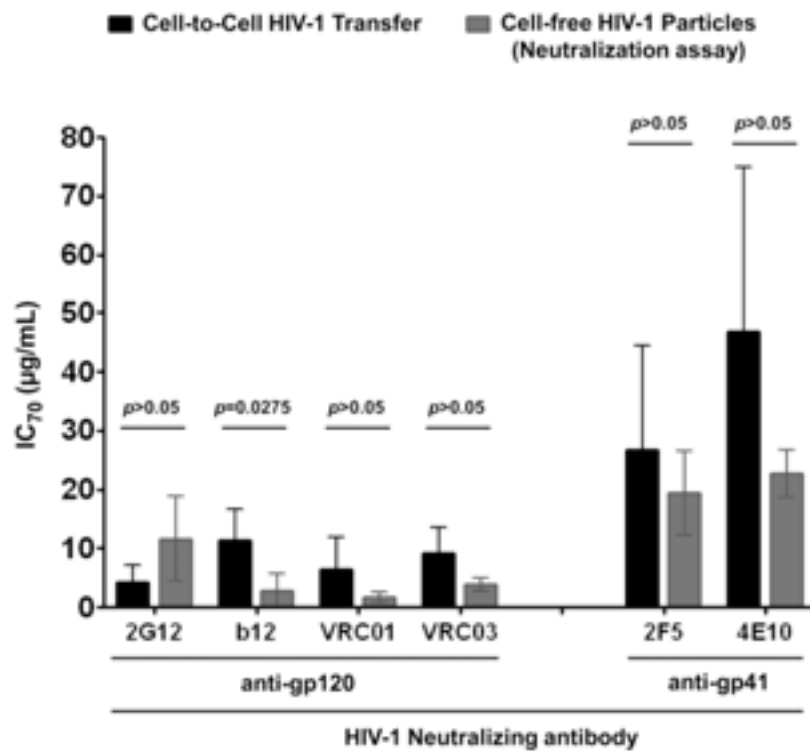


Figure S2



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdool Karim, Q., Abdool Karim, S., Frohlich, J., Grobler, A., Baxter, C., Mansoor, L., Kharsany, A., Sibeko, S., Mlisana, K., Omar, Z., *et al.* (2010). Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science (New York, NY)* 329, 1168-1174.

Abela, I., Berlinger, L., Schanz, M., Reynell, L., Günthard, H., Rusert, P., and Trkola, A. (2012). Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies. *PLoS pathogens* 8.

Ackerman, A., and Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature immunology* 5, 678-684.

Ahmad, R., Sindhu, S., Toma, E., Morisset, R., Vincelette, J., Menezes, J., and Ahmad, A. (2001). Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. *Journal of clinical immunology* 21, 227-233.

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C., Feng, Y., Kennedy, P., Murphy, P., and Berger, E. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science (New York, NY)* 272, 1955-1958.

An, P., Johnson, R., Phair, J., Kirk, G., Yu, X.-F., Donfield, S., Buchbinder, S., Goedert, J., and Winkler, C. (2009). APOBEC3B deletion and risk of HIV-1 acquisition. *The Journal of infectious diseases* 200, 1054-1058.

An, P., Nelson, G., Wang, L., Donfield, S., Goedert, J., Phair, J., Vlahov, D., Buchbinder, S., Farrar, W., Modi, W., *et al.* (2002). Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10002-10007.

An, P., and Winkler, C. (2010). Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends in genetics : TIG* 26, 119-131.

Appay, V., Dunbar, P., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G., Papagno, L., Ogg, G., King, A., Lechner, F., Spina, C., *et al.* (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature medicine* 8, 379-385.

Auvert, B., Taljaard, D., Lagarde, E., Sobngwi-Tambekou, J., Sitta, R., and Puren, A. (2005). Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial. *PLoS medicine* 2.

Ayouba, A., Souquière, S., Njinku, B., Martin, P., Müller-Trutwin, M., Roques, P., Barré-Sinoussi, F., Maucière, P., Simon, F., and Nerrienet, E. (2000). HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS (London, England)* 14, 2623-2625.

B

Baba, T., Jeong, Y., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M., and Ruprecht, R. (1995). Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science (New York, NY)* 267, 1820-1825.

Baba, T., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L., Posner, M., Katinger, H., Stiegler, G., *et al.* (2000). Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nature medicine* 6, 200-206.

- Balazs, A., Chen, J., Hong, C., Rao, D., Yang, L., and Baltimore, D. (2012). Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* *481*, 81-84.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* *18*, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
- Banks, N., Kinsey, N., Clements, J., and Hildreth, J. (2002). Sustained antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in SIV-infected macaques correlates with delayed progression to AIDS. *AIDS research and human retroviruses* *18*, 1197-1205.
- Barbas, C., Björling, E., Chiodi, F., Dunlop, N., Cababa, D., Jones, T., Zebedee, S., Persson, M., Nara, P., and Norrby, E. (1992). Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 9339-9343.
- Barin, F., Cazein, F., Lot, F., Pillonel, J., Brunet, S., Thierry, D., Damond, F., Brun-Vézinet, F., Desenclos, J.-C., and Semaille, C. (2007). Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France: 2003-2006. *AIDS (London, England)* *21*, 2351-2353.
- Barin, F., M'Boup, S., Denis, F., Kanki, P., Allan, J., Lee, T., and Essex, M. (1985). Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* *2*, 1387-1389.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, NY)* *220*, 868-871.
- Bates, E., Fournier, N., Garcia, E., Valladeau, J., Durand, I., Pin, J., Zurawski, S., Patel, S., Abrams, J., Lebecque, S., *et al.* (1999). APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *163*, 1973-1983.
- Bechetoille, N., André, V., Valladeau, J., Perrier, E., and Dezutter-Dambuyant, C. (2006). Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *Journal of leukocyte biology* *80*, 45-58.
- Belmonte, L., Parodi, C., Bare, P., Corti, M., Sanjuan, N., de Bracco, M., and Ruibal-Ares, B. (2006). Spontaneous HIV-1 replication in a B-lymphoblastoid cell line obtained from an HIV-1-positive patient with undetectable plasma viral load. *AIDS (London, England)* *20*, 1340-1342.
- Benjelloun, F., Lawrence, P., Verrier, B., Genin, C., and Paul, S. (2012). Role of human immunodeficiency virus type 1 envelope structure in the induction of broadly neutralizing antibodies. *Journal of virology* *86*, 13152-13163.
- Benlahrech, A., Harris, J., Meiser, A., Papagatsias, T., Hornig, J., Hayes, P., Lieber, A., Athanasopoulos, T., Bachy, V., Csomor, E., *et al.* (2009). Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 19940-19945.

- Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X.-N., Cordeil, S., Bouaziz, S., Muriaux, D., Darlix, J.-L., and Cimarelli, A. (2011). APOBEC3A is a specific inhibitor of the early phases of HIV-1 infection in myeloid cells. *PLoS pathogens* 7.
- Berkhout, B., Floris, R., Recio, I., and Visser, S. (2004). The antiviral activity of the milk protein lactoferrin against the human immunodeficiency virus type 1. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 17, 291-294.
- Bhattacharya, T., Stanton, J., Kim, E.-Y., Kunstman, K., Phair, J., Jacobson, L., and Wolinsky, S. (2009). CCL3L1 and HIV/AIDS susceptibility. *Nature medicine* 15, 1112-1115.
- Biasin, M., Piacentini, L., Lo Caputo, S., Kanari, Y., Magri, G., Trabattoni, D., Naddeo, V., Lopalco, L., Clivio, A., Cesana, E., *et al.* (2007). Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *The Journal of infectious diseases* 195, 960-964.
- Binley, J., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., *et al.* (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *Journal of virology* 78, 13232-13252.
- Blanpain, C., Migeotte, I., Lee, B., Vakili, J., Doranz, B., Govaerts, C., Vassart, G., Doms, R., and Parmentier, M. (1999). CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 94, 1899-1905.
- Bleul, C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.
- Bleul, C., Wu, L., Hoxie, J., Springer, T., and Mackay, C. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1925-1930.
- Blue, C., Spiller, O., and Blackbourn, D. (2004). The relevance of complement to virus biology. *Virology* 319, 176-184.
- Bobardt, M., Saphire, A., Hung, H.-C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G., and Gallay, P. (2003). Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* 18, 27-39.
- Bouhlal, H., Chomont, N., Haeffner-Cavaillon, N., Kazatchkine, M., Belec, L., and Hocini, H. (2002). Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 169, 3301-3306.
- Boyer, J., Cohen, A., Vogt, S., Schumann, K., Nath, B., Ahn, L., Lacy, K., Bagarazzi, M., Higgins, T., Baine, Y., *et al.* (2000). Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *The Journal of infectious diseases* 181, 476-483.
- Bromley, S., Burack, W., Johnson, K., Somersalo, K., Sims, T., Sumen, C., Davis, M., Shaw, A., Allen, P., and Dustin, M. (2001). The immunological synapse. *Annual review of immunology* 19, 375-396.
- Buchbinder, S., Mehrotra, D., Duerr, A., Fitzgerald, D., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P., Lama, J., Marmor, M., Del Rio, C., *et al.* (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity

HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372, 1881-1893.

Bunnik, E., Pisas, L., van Nuenen, A., and Schuitemaker, H. (2008). Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 82, 7932-7941.

Burton, D., Barbas, C., Persson, M., Koenig, S., Chanock, R., and Lerner, R. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10134-10137.

Burton, D., Desrosiers, R., Doms, R., Koff, W., Kwong, P., Moore, J., Nabel, G., Sodroski, J., Wilson, I., and Wyatt, R. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature immunology* 5, 233-236.

Burton, D., Hessel, A., Keele, B., Klasse, P., Ketas, T., Moldt, B., Dunlop, D., Poignard, P., Doyle, L., Cavacini, L., *et al.* (2011). Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11181-11186.

Burton, D., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S., Thornton, G., Parren, P., Sawyer, L., Hendry, R., Dunlop, N., and Nara, P. (1994). Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science (New York, NY)* 266, 1024-1027.

C

Calarese, D., Scanlan, C., Zwick, M., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M., Stanfield, R., Roux, K., *et al.* (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science (New York, NY)* 300, 2065-2071.

Cameron, P., Forsum, U., Tepler, H., Granelli-Piperno, A., and Steinman, R. (1992). During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clinical and experimental immunology* 88, 226-236.

Campo, J., Perea, M., del Romero, J., Cano, J., Hernando, V., and Bascones, A. (2006). Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral diseases* 12, 219-228.

Canque, B., Bakri, Y., Camus, S., Yagello, M., Benjouad, A., and Gluckman, J. (1999). The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* 93, 3866-3875.

Carr, J., Hocking, H., Li, P., and Burrell, C. (1999). Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology* 265, 319-329.

Carrington, M., Martin, M., and van Bergen, J. (2008). KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends in microbiology* 16, 620-627.

Carrington, M., Nelson, G., Martin, M., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S. (1999). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science (New York, NY)* 283, 1748-1752.

- Carrington, M., and O'Brien, S. (2003). The influence of HLA genotype on AIDS. *Annual review of medicine* 54, 535-551.
- Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J., and Greene, W. (2007). In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS pathogens* 3.
- Centers for Disease, C. (1981a). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 30, 305-308.
- Centers for Disease, C. (1981b). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 30, 250-252.
- Champagne, P., Ogg, G., King, A., Knabenhans, C., Ellefsen, K., Nobile, M., Appay, V., Rizzardi, G., Fleury, S., Lipp, M., *et al.* (2001). Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410, 106-111.
- Chan, R. (2012). Biomedical strategies for human immunodeficiency virus (HIV) prevention? A new paradigm. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 41, 595-601.
- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., and Clavel, F. (1994). HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *Journal of molecular biology* 241, 651-662.
- Checkley, M., Lutge, B., and Freed, E. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of molecular biology* 410, 582-608.
- Chen, P., Hübner, W., Spinelli, M., and Chen, B. (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *Journal of virology* 81, 12582-12595.
- Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D., Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., Kanu, J., Sadek, R., Yee, J., Ho, D., *et al.* (1997). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *Journal of virology* 71, 3953-3960.
- Chen, Z., Telfer, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D., and Marx, P. (1996). Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *Journal of virology* 70, 3617-3627.
- Chu, H., Wang, J.-J., Qi, M., Yoon, J.-J., Wen, X., Chen, X., Ding, L., and Spearman, P. (2012). The intracellular virus-containing compartments in primary human macrophages are largely inaccessible to antibodies and small molecules. *PloS one* 7.
- Clavel, F., Brun-Vézinet, F., Guétard, D., Chamaret, S., Laurent, A., Rouzioux, C., Rey, M., Katlama, C., Rey, F., and Champelinaud, J. (1986). [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série III, Sciences de la vie* 302, 485-488.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., and Vogt, P. (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.
- Cohen, M., Chen, Y., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M., Kumarasamy, N., Hakim, J., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J., *et al.* (2011). Prevention of HIV-1

infection with early antiretroviral therapy. *The New England journal of medicine* 365, 493-505.

Cole, A. (2006). Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Current topics in microbiology and immunology* 306, 199-230.

Coleman, C.M.G., Corine S; Wu Li (2013). Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells.pdf. *Advances in experimental medicine and biology*.

Coombs, R., Reichelderfer, P., and Landay, A. (2003). Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS (London, England)* 17, 455-480.

Corti, D., and Lanzavecchia, A. (2013). Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annual review of immunology* 31, 705-742.

Cranage, M., Sharpe, S., Herrera, C., Cope, A., Dennis, M., Berry, N., Ham, C., Heeney, J., Rezk, N., Kashuba, A., *et al.* (2008). Prevention of SIV rectal transmission and priming of T cell responses in macaques after local pre-exposure application of tenofovir gel. *PLoS medicine* 5.

Cunningham, A., Harman, A., and Nasr, N. (2013). Initial HIV mucosal infection and dendritic cells. *EMBO molecular medicine* 5, 658-660.

Curlin, M., Gottlieb, G., Hawes, S., Sow, P., Ndoye, I., Critchlow, C., Kiviat, N., and Mullins, J. (2004). No evidence for recombination between HIV type 1 and HIV type 2 within the envelope region in dually seropositive individuals from Senegal. *AIDS research and human retroviruses* 20, 958-963.

Cutler, C., and Jotwani, R. (2006). Oral mucosal expression of HIV-1 receptors, co-receptors, and alpha-defensins: tableau of resistance or susceptibility to HIV infection? *Advances in dental research* 19, 49-51.

D

Dalgleish, A., Beverley, P., Clapham, P., Crawford, D., Greaves, M., and Weiss, R. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.

Damond, F., Worobey, M., Campa, P., Farfara, I., Colin, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., Robertson, D., and Simon, F. (2004). Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS research and human retroviruses* 20, 666-672.

Daniel, M., Kirchhoff, F., Czajak, S., Sehgal, P., and Desrosiers, R. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science (New York, NY)* 258, 1938-1941.

de Witte, L., Bobardt, M., Chatterji, U., Degeest, G., David, G., Geijtenbeek, T., and Gally, P. (2007a). Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19464-19469.

de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T. (2007b). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature medicine* 13, 367-371.

Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G., Smith, M., Allikmets, R., Goedert, J., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Gomperts, E., *et al.* (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene.

Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* (New York, NY) *273*, 1856-1862.

Deeks, S., Schweighardt, B., Wrin, T., Galovich, J., Hoh, R., Sinclair, E., Hunt, P., McCune, J., Martin, J., Petropoulos, C., *et al.* (2006). Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *Journal of virology* *80*, 6155-6164.

Deeks, S., and Walker, B. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* *27*, 406-416.

Demirov, D., and Freed, E. (2004). Retrovirus budding. *Virus research* *106*, 87-102.

Demirov, D., Orenstein, J., and Freed, E. (2002). The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *Journal of virology* *76*, 105-117.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R., Hill, C., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* *381*, 661-666.

Dennison, S., Stewart, S., Stempel, K., Liao, H.-X., Haynes, B., and Alam, S. (2009). Stable docking of neutralizing human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 is dependent on the membrane immersion depth of their epitope regions. *Journal of virology* *83*, 10211-10223.

Derdeyn, C., Decker, J., Bibollet-Ruche, F., Mokili, J., Muldoon, M., Denham, S., Heil, M., Kasolo, F., Musonda, R., Hahn, B., *et al.* (2004). Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* (New York, NY) *303*, 2019-2022.

Dimitrov, D., Willey, R., Sato, H., Chang, L., Blumenthal, R., and Martin, M. (1993). Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *Journal of virology* *67*, 2182-2190.

Dimmock, N.J. (1995). Update on the neutralisation of animal viruses. *Reviews in Medical Virology* *5*.

Dirac, A., Huthoff, H., Kijms, J., and Berkhout, B. (2002). Requirements for RNA heterodimerization of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 genomes. *The Journal of general virology* *83*, 2533-2542.

Doncel, G., Joseph, T., and Thurman, A. (2011). Role of semen in HIV-1 transmission: inhibitor or facilitator? *American journal of reproductive immunology* (New York, NY : 1989) *65*, 292-301.

Donoval, B., Landay, A., Moses, S., Agot, K., Ndinya-Achola, J., Nyagaya, E., MacLean, I., and Bailey, R. (2006). HIV-1 target cells in foreskins of African men with varying histories of sexually transmitted infections. *American journal of clinical pathology* *125*, 386-391.

Doranz, B., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R., Samson, M., Peiper, S., Parmentier, M., Collman, R., and Doms, R. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* *85*, 1149-1158.

Doria-Rose, N., Georgiev, I., O'Dell, S., Chuang, G.-Y., Staube, R., McLellan, J., Gorman, J., Pancera, M., Bonsignori, M., Haynes, B., *et al.* (2012). A short segment of the HIV-1 gp120

V1/V2 region is a major determinant of resistance to V1/V2 neutralizing antibodies. *Journal of virology* 86, 8319-8323.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G., Martin, S., Huang, Y., Nagashima, K., Cayanan, C., Maddon, P., Koup, R., Moore, J., *et al.* (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673.

Duggal, P., Winkler, C., An, P., Yu, X.-F., Farzadegan, H., O'Brien, S., Beaty, T., and Vlahov, D. (2005). The effect of RANTES chemokine genetic variants on early HIV-1 plasma RNA among African American injection drug users. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999) 38, 584-589.

Duliège, A., Amos, C., Felton, S., Biggar, R., and Goedert, J. (1995). Birth order, delivery route, and concordance in the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mothers to twins. *International Registry of HIV-Exposed Twins. The Journal of pediatrics* 126, 625-632.

Durham, N., Yewdall, A., Chen, P., Lee, R., Zony, C., Robinson, J., and Chen, B. (2012). Neutralization resistance of virological synapse-mediated HIV-1 Infection is regulated by the gp41 cytoplasmic tail. *Journal of virology* 86, 7484-7495.

E, F

Edo-Matas, D., van Dort, K., Setiawan, L., Schuitemaker, H., and Kootstra, N. (2011). Comparison of in vivo and in vitro evolution of CCR5 to CXCR4 coreceptor use of primary human immunodeficiency virus type 1 variants. *Virology* 412, 269-277.

Eisele, E., and Siliciano, R. (2012). Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity* 37, 377-388.

Euler, Z., van Gils, M., Bunnik, E., Phung, P., Schweighardt, B., Wrin, T., and Schuitemaker, H. (2010). Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *The Journal of infectious diseases* 201, 1045-1053.

Fahey, J., and Wira, C. (2002). Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *The Journal of infectious diseases* 185, 1606-1613.

Fahrbach, K., Barry, S., Ayehunie, S., Lamore, S., Klausner, M., and Hope, T. (2007). Activated CD34-derived Langerhans cells mediate transinfection with human immunodeficiency virus. *Journal of virology* 81, 6858-6868.

Fassati, A., and Goff, S. (2001). Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 75, 3626-3635.

Fauci, A. (1996). Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384, 529-534.

Fauci, A., Mavilio, D., and Kottlilil, S. (2005). NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nature reviews Immunology* 5, 835-843.

Feng, Y., Broder, C., Kennedy, P., and Berger, E. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science (New York, NY)* 272, 872-877.

Ferrantelli, F., Hofmann-Lehmann, R., Rasmussen, R., Wang, T., Xu, W., Li, P.-L., Montefiori, D., Cavacini, L., Katinger, H., Stiegler, G., *et al.* (2003). Post-exposure prophylaxis with human monoclonal antibodies prevented SHIV89.6P infection or disease in neonatal macaques. *AIDS (London, England)* 17, 301-309.

Field, S., Howson, J.M., Maier, L., Walker, S., Walker, N., Smyth, D., Armour, J., Clayton, D., and Todd, J. (2009). Experimental aspects of copy number variant assays at CCL3L1. *Nature medicine* *15*, 1115-1117.

Flynn, N., Forthal, D., Harro, C., Judson, F., Mayer, K., Para, M., and rgp, H.I.V.V.S.G. (2005). Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* *191*, 654-665.

Forthal, D., and Moog, C. (2009). Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Current opinion in HIV and AIDS* *4*, 388-393.

G

Ganesh, L., Leung, K., Loré, K., Levin, R., Panet, A., Schwartz, O., Koup, R., and Nabel, G. (2004). Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. *Journal of virology* *78*, 11980-11987.

Ganser-Pornillos, B., Yeager, M., and Sundquist, W. (2008). The structural biology of HIV assembly. *Current opinion in structural biology* *18*, 203-217.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D., Chen, Y., Rodenburg, C., Michael, S., Cummins, L., Arthur, L., Peeters, M., Shaw, G., *et al.* (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* *397*, 436-441.

Gao, X., Nelson, G., Karacki, P., Martin, M., Phair, J., Kaslow, R., Goedert, J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., *et al.* (2001). Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *The New England journal of medicine* *344*, 1668-1675.

Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J.-F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J.-M., Demaurex, N., Marsh, M., *et al.* (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* *6*, 488-501.

Geijtenbeek, T., Kwon, D., Torensma, R., van Vliet, S., van Duijnhoven, G., Middel, J., Cornelissen, I., Nottet, H., KewalRamani, V., Littman, D., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* *100*, 587-597.

Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J., Dy, M., Brousse, N., and Hermine, O. (1998). Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* *187*, 961-966.

Ghys, P., Fransen, K., Diallo, M., Ettiègne-Traoré, V., Coulibaly, I., Yeboué, K., Kalish, M., Maurice, C., Whitaker, J., Greenberg, A., *et al.* (1997). The associations between cervicovaginal HIV shedding, sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS (London, England)* *11*, 93.

Girard, M., and Plotkin, S. (2012). HIV vaccine development at the turn of the 21st century. *Current opinion in HIV and AIDS* *7*, 4-9.

Goldstone, D., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J., Groom, H., Rice, G., Christodoulou, E., Walker, P., Kelly, G., Haire, L., Yap, M., *et al.* (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* *480*, 379-382.

- Gómez-Román, V., Patterson, L., Venzon, D., Liewehr, D., Aldrich, K., Florese, R., and Robert-Guroff, M. (2005). Vaccine-elicited antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity correlated with significantly reduced acute viremia in rhesus macaques challenged with SIVmac251. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *174*, 2185-2189.
- Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., Nibbs, R., Freedman, B., Quinones, M., Bamshad, M., *et al.* (2005). The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science (New York, NY)* *307*, 1434-1440.
- Gordon, S., and Taylor, P. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* *5*, 953-964.
- Gorny, M., Conley, A., Karwowska, S., Buchbinder, A., Xu, J., Emini, E., Koenig, S., and Zolla-Pazner, S. (1992). Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *Journal of virology* *66*, 7538-7542.
- Gousset, K., Ablan, S., Coren, L., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D., and Freed, E. (2008). Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS pathogens* *4*.
- Gramberg, T., Kahle, T., Bloch, N., Wittmann, S., Müllers, E., Daddacha, W., Hofmann, H., Kim, B., Lindemann, D., and Landau, N. (2013). Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. *Retrovirology* *10*, 26.
- Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., and Steinman, R. (1998). Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *Journal of virology* *72*, 2733-2737.
- Grant, R., Lama, J., Anderson, P., McMahan, V., Liu, A., Vargas, L., Goicochea, P., Casapía, M., Guanira-Carranza, J., Ramirez-Cardich, M., *et al.* (2010). Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *The New England journal of medicine* *363*, 2587-2599.
- Gras, G., and Kaul, M. (2010). Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology* *7*, 30.
- Gray, E., Madiga, M., Hermanus, T., Moore, P., Wibmer, C., Tumba, N., Werner, L., Mlisana, K., Sibeko, S., Williamson, C., *et al.* (2011). The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *Journal of virology* *85*, 4828-4840.
- Greene, W., and Peterlin, B. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature medicine* *8*, 673-680.
- Gringhuis, S., van der Vlist, M., van den Berg, L., den Dunnen, J., Litjens, M., and Geijtenbeek, T. (2010). HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nature immunology* *11*, 419-426.
- Groot, F., Welsch, S., and Sattentau, Q. (2008). Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood* *111*, 4660-4663.
- Gupta, P., Collins, K., Ratner, D., Watkins, S., Naus, G., Landers, D., and Patterson, B. (2002). Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *Journal of virology* *76*, 9868-9876.

H

- Hahn, B., Shaw, G., De Cock, K., and Sharp, P. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science (New York, NY)* 287, 607-614.
- Harman, A., Kim, M., Nasr, N., Sandgren, K., and Cameron, P. (2013). Tissue dendritic cells as portals for HIV entry. *Reviews in Medical Virology* 23, 319-333.
- Haynes, B., Fleming, J., St Clair, E., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Searce, R., Plonk, K., Staats, H., *et al.* (2005). Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science (New York, NY)* 308, 1906-1908.
- Haynes, B., Gilbert, P., McElrath, M., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G., Alam, S., Evans, D., Montefiori, D., Karnasuta, C., Sutthent, R., *et al.* (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *The New England journal of medicine* 366, 1275-1286.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P., and Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS (London, England)* 20, 23.
- Hendrickson, S., Jacobson, L., Nelson, G., Phair, J., Lautenberger, J., Johnson, R., Kingsley, L., Margolick, J., Detels, R., Goedert, J., *et al.* (2008). Host genetic influences on highly active antiretroviral therapy efficacy and AIDS-free survival. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 48, 263-271.
- Hessell, A., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C., Beurskens, F., Bakker, J., Lanigan, C., Landucci, G., Forthal, D., Parren, P., *et al.* (2007). Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 449, 101-104.
- Hessell, A., Poignard, P., Hunter, M., Hangartner, L., Tehrani, D., Bleeker, W., Parren, P., Marx, P., and Burton, D. (2009a). Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nature medicine* 15, 951-954.
- Hessell, A., Rakasz, E., Poignard, P., Hangartner, L., Landucci, G., Forthal, D., Koff, W., Watkins, D., and Burton, D. (2009b). Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS pathogens* 5.
- Hessell, A., Rakasz, E., Tehrani, D., Huber, M., Weisgrau, K., Landucci, G., Forthal, D., Koff, W., Poignard, P., Watkins, D., *et al.* (2010). Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *Journal of virology* 84, 1302-1313.
- Hidajat, R., Xiao, P., Zhou, Q., Venzon, D., Summers, L., Kalyanaraman, V., Montefiori, D., and Robert-Guroff, M. (2009). Correlation of vaccine-elicited systemic and mucosal nonneutralizing antibody activities with reduced acute viremia following intrarectal simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of rhesus macaques. *Journal of virology* 83, 791-801.
- Hirbod, T., Nilsson, J., Andersson, S., Uberti-Foppa, C., Ferrari, D., Manghi, M., Andersson, J., Lopalco, L., and Broliden, K. (2006). Upregulation of interferon-alpha and RANTES in the cervix of HIV-1-seronegative women with high-risk behavior. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* 43, 137-143.
- Ho, D., Neumann, A., Perelson, A., Chen, W., Leonard, J., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.

- Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Rasmussen, R., Jiang, S., Li, P., Baba, T., Montefiori, D., Bernacky, B., Rizvi, T., Schmidt, R., *et al.* (2002). Postnatal pre- and postexposure passive immunization strategies: protection of neonatal macaques against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *Journal of medical primatology* 31, 109-119.
- Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Rasmussen, R., Smith, B., Baba, T., Liska, V., Ferrantelli, F., Montefiori, D., McClure, H., Anderson, D., *et al.* (2001). Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *Journal of virology* 75, 7470-7480.
- Holl, V., Hemmerter, S., Burrer, R., Schmidt, S., Bohbot, A., Aubertin, A.-M., and Moog, C. (2004). Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 173, 6274-6283.
- Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.-M., and Moog, C. (2006a). Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *Journal of virology* 80, 6177-6181.
- Holl, V., Peressin, M., Schmidt, S., Decoville, T., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.-M., and Moog, C. (2006b). Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. *Blood* 107, 4466-4474.
- Holl, V., Xu, K., Peressin, M., Lederle, A., Biedma, M., Delaporte, M., Decoville, T., Schmidt, S., Laumond, G., Aubertin, A.-M., *et al.* (2010). Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. *Journal of virology* 84, 4172-4182.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658-661.
- Hu, J., Gardner, M., and Miller, C. (2000). Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *Journal of virology* 74, 6087-6095.
- Hu, J., Miller, C., O'Doherty, U., Marx, P., and Pope, M. (1999). The dendritic cell-T cell milieu of the lymphoid tissue of the tonsil provides a locale in which SIV can reside and propagate at chronic stages of infection. *AIDS research and human retroviruses* 15, 1305-1314.
- Hu, Q., Frank, I., Williams, V., Santos, J., Watts, P., Griffin, G., Moore, J., Pope, M., and Shattock, R. (2004). Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *The Journal of experimental medicine* 199, 1065-1075.
- Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M., Doria-Rose, N., Longo, N., Imamichi, H., Bailer, R., Chakrabarti, B., Sharma, S., *et al.* (2012). Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491, 406-412.
- Huang, X.-L., Fan, Z., Gupta, P., and Rinaldo, C. (2006). Activation of HIV type 1 specific cytotoxic T lymphocytes from semen by HIV type 1 antigen-presenting dendritic cells and IL-12. *AIDS research and human retroviruses* 22, 93-98.
- Huber, M., and Trkola, A. (2007). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *Journal of internal medicine* 262, 5-25.

Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., *et al.* (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* *360*, 692-698.

I, J

IAVI (2013). Database of vaccine candidates in clinical trials.

Igarashi, T., Brown, C., Endo, Y., Buckler-White, A., Plishka, R., Bischofberger, N., Hirsch, V., and Martin, M. (2001). Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 658-663.

Ioannidis, J., Rosenberg, P., Goedert, J., Ashton, L., Benfield, T., Buchbinder, S., Coutinho, R., Eugen-Olsen, J., Gallart, T., Katzenstein, T., *et al.* (2001). Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Annals of internal medicine* *135*, 782-795.

Iqbal, S., Ball, T., Kimani, J., Kiama, P., Thottingal, P., Embree, J., Fowke, K., and Plummer, F. (2005). Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *The Journal of infectious diseases* *192*, 728-738.

Johnson, P., Schnepf, B., Zhang, J., Connell, M., Greene, S., Yuste, E., Desrosiers, R., and Clark, K. (2009). Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys. *Nature medicine* *15*, 901-906.

Johnston, M., and Fauci, A. (2007). An HIV vaccine--evolving concepts. *The New England journal of medicine* *356*, 2073-2081.

Jolly, C., Mitar, I., and Sattentau, Q. (2007). Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *Journal of virology* *81*, 13916-13921.

Jönsson, F., and Daëron, M. (2012). Mast cells and company. *Frontiers in immunology* *3*, 16.

Joyner, A., Willis, J., Crowe, J., and Aiken, C. (2011). Maturation-induced cloaking of neutralization epitopes on HIV-1 particles. *PLoS pathogens* *7*.

K

Kaech, S., Wherry, E., and Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature reviews Immunology* *2*, 251-262.

Kawamura, T., Gulden, F., Sugaya, M., McNamara, D., Borris, D., Lederman, M., Orenstein, J., Zimmerman, P., and Blauvelt, A. (2003). R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 8401-8406.

Kawamura, T., Koyanagi, Y., Nakamura, Y., Ogawa, Y., Yamashita, A., Iwamoto, T., Ito, M., Blauvelt, A., and Shimada, S. (2008). Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *180*, 3297-3304.

Keele, B., Giorgi, E., Salazar-Gonzalez, J., Decker, J., Pham, K., Salazar, M., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., *et al.* (2008). Identification and characterization of transmitted

and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 7552-7557.

Keele, B., Jones, J., Terio, K., Estes, J., Rudicell, R., Wilson, M., Li, Y., Learn, G., Beasley, T., Schumacher-Stankey, J., *et al.* (2009). Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* *460*, 515-519.

Kim, B., Nguyen, L., Daddacha, W., and Hollenbaugh, J. (2012). Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. *The Journal of biological chemistry* *287*, 21570-21574.

Kitabwalla, M., Ferrantelli, F., Wang, T., Chalmers, A., Katinger, H., Stiegler, G., Cavacini, L., Chou, T.-C., and Ruprecht, R. (2003). Primary African HIV clade A and D isolates: effective cross-clade neutralization with a quadruple combination of human monoclonal antibodies raised against clade B. *AIDS research and human retroviruses* *19*, 125-131.

Klasse, P., and Sattentau, Q. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *The Journal of general virology* *83*, 2091-2108.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruet, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* *312*, 767-768.

Klein, F., Gaebler, C., Mouquet, H., Sather, D., Lehmann, C., Scheid, J., Kraft, Z., Liu, Y., Pietzsch, J., Hurley, A., *et al.* (2012). Broad neutralization by a combination of antibodies recognizing the CD4 binding site and a new conformational epitope on the HIV-1 envelope protein. *The Journal of experimental medicine* *209*, 1469-1479.

Koenig, S., Gendelman, H., Orenstein, J., Dal Canto, M., Pezeshkpour, G., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M., and Fauci, A. (1986). Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science (New York, NY)* *233*, 1089-1093.

Koizumi, Y., Kageyama, S., Fujiyama, Y., Miyashita, M., Lwembe, R., Ogino, K., Shioda, T., and Ichimura, H. (2007). RANTES -28G delays and DC-SIGN - 139C enhances AIDS progression in HIV type 1-infected Japanese hemophiliacs. *AIDS research and human retroviruses* *23*, 713-719.

Kolchinsky, P., Kiprilov, E., and Sodroski, J. (2001). Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. *Journal of virology* *75*, 2041-2050.

Koppensteiner, H., Banning, C., Schneider, C., Hohenberg, H., and Schindler, M. (2012). Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies. *Journal of virology* *86*, 2826-2836.

Koulinska, I., Villamor, E., Msamanga, G., Fawzi, W., Blackard, J., Renjifo, B., and Essex, M. (2006). Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes. *Virus research* *120*, 191-198.

Koziel, H., Eichbaum, Q., Kruskal, B., Pinkston, P., Rogers, R., Armstrong, M., Richards, F., Rose, R., and Ezekowitz, R. (1998). Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *The Journal of clinical investigation* *102*, 1332-1344.

Kwon, D., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W., and Littman, D. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16, 135-144.

Kwong, P., and Mascola, J. (2012). Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. *Immunity* 37, 412-425.

L

Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654-657.

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., *et al.* (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature immunology* 13, 223-228.

Lambert, A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A., and Tremblay, M. (2008). The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112, 1299-1307.

Lamotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N., Liao, H.-X., Parks, R., Hicks, C., Owzar, K., Tomaras, G., Montefiori, D., *et al.* (2009). Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS (London, England)* 23, 897-906.

Langley, C., Benga-De, E., Critchlow, C., Ndoye, I., Mbengue-Ly, M., Kuypers, J., Woto-Gaye, G., Mboup, S., Bergeron, C., Holmes, K., *et al.* (1996). HIV-1, HIV-2, human papillomavirus infection and cervical neoplasia in high-risk African women. *AIDS (London, England)* 10, 413-417.

Lederman, M., Kalish, L., Asmuth, D., Fiebig, E., Mileno, M., and Busch, M. (2000). 'Modeling' relationships among HIV-1 replication, immune activation and CD4+ T-cell losses using adjusted correlative analyses. *AIDS (London, England)* 14, 951-958.

Lee, B., Leslie, G., Soilleux, E., O'Doherty, U., Baik, S., Levroney, E., Flummerfelt, K., Swiggard, W., Coleman, N., Malim, M., *et al.* (2001). cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *Journal of virology* 75, 12028-12038.

Leroy, V., Newell, M., Dabis, F., Peckham, C., Van de Perre, P., Bulterys, M., Kind, C., Simonds, R., Wiktor, S., and Msellati, P. (1998). International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. *Lancet* 352, 597-600.

Letvin, N., Schmitz, J., Jordan, H., Seth, A., Hirsch, V., Reimann, K., and Kuroda, M. (1999). Cytotoxic T lymphocytes specific for the simian immunodeficiency virus. *Immunological reviews* 170, 127-134.

Levy, J., Hoffman, A., Kramer, S., Landis, J., Shimabukuro, J., and Oshiro, L. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science (New York, NY)* 225, 840-842.

Li, D., Romain, G., Flamar, A.-L., Duluc, D., Dullaers, M., Li, X.-H., Zurawski, S., Bosquet, N., Palucka, A., Le Grand, R., *et al.* (2012). Targeting self- and foreign antigens to dendritic

cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 209, 109-121.

Lissouba, P., Taljaard, D., Rech, D., Dermaux-Msimang, V., Legeai, C., Lewis, D., Singh, B., Puren, A., and Auvert, B. (2011). Adult male circumcision as an intervention against HIV: an operational study of uptake in a South African community (ANRS 12126). *BMC infectious diseases* 11, 253.

Liu, Y. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259-262.

Lole, K., Bollinger, R., Paranjape, R., Gadkari, D., Kulkarni, S., Novak, N., Ingersoll, R., Sheppard, H., and Ray, S. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of virology* 73, 152-160.

Londish, G., Templeton, D., Regan, D., Kaldor, J., and Murray, J. (2010). Minimal impact of circumcision on HIV acquisition in men who have sex with men. *Sexual health* 7, 463-470.

Lü, F., and Jacobson, R. (2007). Oral mucosal immunity and HIV/SIV infection. *Journal of dental research* 86, 216-226.

M

Mahalanabis, M., Jayaraman, P., Miura, T., Pereyra, F., Chester, E., Richardson, B., Walker, B., and Haigwood, N. (2009). Continuous viral escape and selection by autologous neutralizing antibodies in drug-naïve human immunodeficiency virus controllers. *Journal of virology* 83, 662-672.

Malim, M., and Bieniasz, P. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.

Mao, Y., Wang, L., Gu, C., Herschhorn, A., Xiang, S.-H., Haim, H., Yang, X., and Sodroski, J. (2012). Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nature structural & molecular biology* 19, 893-899.

Martellini, J., Cole, A., Venkataraman, N., Quinn, G., Svoboda, P., Gangrade, B., Pohl, J., Sørensen, O., and Cole, A. (2009). Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3609-3618.

Martin, N., and Sattentau, Q. (2009). Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion. *Current opinion in HIV and AIDS* 4, 143-149.

Martin, N., Welsch, S., Jolly, C., Briggs, J., Vaux, D., and Sattentau, Q. (2010). Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition. *Journal of virology* 84, 3516-3527.

Mascola, J., Lewis, M., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T., Hayes, D., Louder, M., Brown, C., Sapan, C., Frankel, S., *et al.* (1999). Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *Journal of virology* 73, 4009-4018.

Mascola, J., Stiegler, G., VanCott, T., Katinger, H., Carpenter, C., Hanson, C., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S., Birx, D., *et al.* (2000). Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature medicine* 6, 207-210.

- Mascola, J.R. (2002). Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* 20, 1922-1925.
- Massanella, M., Puigdomènech, I., Cabrera, C., Fernandez-Figueras, M., Aucher, A., Gaibelet, G., Hudrisier, D., García, E., Bofill, M., Clotet, B., *et al.* (2009). Antigenp41 antibodies fail to block early events of virological synapses but inhibit HIV spread between T cells. *AIDS (London, England)* 23, 183-188.
- Matreyek, K., and Engelman, A. (2013). Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses* 5, 2483-2511.
- Mc Cann, C., Song, R., and Ruprecht, R. (2005). Antibodies: can they protect against HIV infection? *Current drug targets Infectious disorders* 5, 95-111.
- McCaffrey, R., Saunders, C., Hensel, M., and Stamatatos, L. (2004). N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *Journal of virology* 78, 3279-3295.
- McCoombe, S., and Short, R. (2006). Potential HIV-1 target cells in the human penis. *AIDS (London, England)* 20, 1491-1495.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S., KewalRamani, V., Unutmaz, D., and Hope, T. (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science (New York, NY)* 300, 1295-1297.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J., Oksenhendler, E., Debré, P., and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *Journal of virology* 69, 4737-4745.
- McLellan, J., Pancera, M., Carrico, C., Gorman, J., Julien, J.-P., Khayat, R., Louder, R., Pejchal, R., Sastry, M., Dai, K., *et al.* (2011). Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 480, 336-343.
- McNeely, T., Dealy, M., Dripps, D., Orenstein, J., Eisenberg, S., and Wahl, S. (1995). Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *The Journal of clinical investigation* 96, 456-464.
- Mehandru, S., Wrin, T., Galovich, J., Stiegler, G., Vcelar, B., Hurley, A., Hogan, C., Vasan, S., Katinger, H., Petropoulos, C., *et al.* (2004). Neutralization profiles of newly transmitted human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *Journal of virology* 78, 14039-14042.
- Meng, G., Wei, X., Wu, X., Sellers, M., Decker, J., Moldoveanu, Z., Orenstein, J., Graham, M., Kappes, J., Mestecky, J., *et al.* (2002). Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nature medicine* 8, 150-156.
- Merad, M., and Manz, M. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418-3427.
- Migueles, S., Laborico, A., Shupert, W., Sabbaghian, M., Rabin, R., Hallahan, C., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., *et al.* (2002). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature immunology* 3, 1061-1068.
- Mikell, I., Sather, D., Kalams, S., Altfeld, M., Alter, G., and Stamatatos, L. (2011). Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. *PLoS pathogens* 7.

Miller, C., Li, Q., Abel, K., Kim, E.-Y., Ma, Z.-M., Wietgreffe, S., La Franco-Scheuch, L., Compton, L., Duan, L., Shore, M., *et al.* (2005). Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* 79, 9217-9227.

Millett, G., Flores, S., Marks, G., Reed, J., and Herbst, J. (2008). Circumcision status and risk of HIV and sexually transmitted infections among men who have sex with men: a meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 300, 1674-1684.

Moog, C., Dereuddre-Bosquet, N., Teillaud, J.L., Biedma, M., Holl, V., Van Ham, G., Heyndrickx, L., Van Dorselaer, A., Katinger, D., Vcelar, B., *et al.* (2013). Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal immunology*.

Moog, C., Fleury, H., Pellegrin, I., Kim, A., and Aubertin, A. (1997). Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Journal of virology* 71, 3734-3741.

Münch, J., Rücker, E., Ständker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., *et al.* (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059-1071.

Murray, P., and Wynn, T. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology* 11, 723-737.

Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rüter, F., and Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 67, 6642-6647.

N, O

Nag, P., Kim, J., Sapiaga, V., Landay, A., Bremer, J., Mestecky, J., Reichelderfer, P., Kovacs, A., Cohn, J., Weiser, B., *et al.* (2004). Women with cervicovaginal antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity have lower genital HIV-1 RNA loads. *The Journal of infectious diseases* 190, 1970-1978.

Nguyen, D., and Hildreth, J. (2003). Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *European journal of immunology* 33, 483-493.

Nobile, C., Moris, A., Porrot, F., Sol-Foulon, N., and Schwartz, O. (2003). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *Journal of virology* 77, 5313-5323.

O'Brien, S., and Nelson, G. (2004). Human genes that limit AIDS. *Nature genetics* 36, 565-574.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J., Clark-Lewis, I., Legler, D., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.

Ofek, G., McKee, K., Yang, Y., Yang, Z.-Y., Skinner, J., Guenaga, F., Wyatt, R., Zwick, M., Nabel, G., Mascola, J., *et al.* (2010). Relationship between antibody 2F5 neutralization of HIV-1 and hydrophobicity of its heavy chain third complementarity-determining region. *Journal of virology* 84, 2955-2962.

Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J., Wyatt, R., and Kwong, P. (2004). Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *Journal of virology* 78, 10724-10737.

Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Ugucioni, M. (2001). Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 97, 1920-1924.

OMS (2010). Dépistage des infections transmissibles par transfusion dans les dons du sang - Recommandations.

Ostrowski, M., Chun, T., Justement, S., Motola, I., Spinelli, M., Adelsberger, J., Ehler, L., Mizell, S., Hallahan, C., and Fauci, A. (1999). Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Journal of virology* 73, 6430-6435.

Overbaugh, J., and Morris, L. (2012). *The Antibody Response against HIV-1*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2.

P

Pantophlet, R., and Burton, D. (2006). GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annual review of immunology* 24, 739-769.

Parren, P., Marx, P., Hessel, A., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J., and Burton, D. (2001). Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *Journal of virology* 75, 8340-8347.

Patterson, B., Landay, A., Siegel, J., Flener, Z., Pessis, D., Chaviano, A., and Bailey, R. (2002). Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture. *The American journal of pathology* 161, 867-873.

Peeters, M., Honoré, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R., and Delaporte, E. (1989). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS (London, England)* 3, 625-630.

Peeters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, A., Mpoudi, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E., and Saragosti, S. (1999). Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *Journal of virology* 73, 7368-7375.

Peeters, M., Lobe, V., Nkengasong, J., Willems, B., Delforge, M., Van Renterghem, L., Revets, H., Sprecher, S., and van der Groen, G. (1995). HIV-1 group O infection in Belgium. *Acta clinica Belgica* 50, 171-173.

Peña-Cruz, V., Ito, S., Oukka, M., Yoneda, K., Dascher, C., Von Lichtenberg, F., and Sugita, M. (2001). Extraction of human Langerhans cells: a method for isolation of epidermis-resident dendritic cells. *Journal of immunological methods* 255, 83-91.

Perelson, A., Neumann, A., Markowitz, M., Leonard, J., and Ho, D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science (New York, NY)* 271, 1582-1586.

Peressin, M., Holl, V., Schmidt, S., Decoville, T., Mirisky, D., Lederle, A., Delaporte, M., Xu, K., Aubertin, A., and Moog, C. (2011). HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies. *Journal of virology* 85, 1077-1085.

- Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, B., Wiegand, A., Rothchild, A., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, M., *et al.* (2009). Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters. *The Journal of infectious diseases* 200, 984-990.
- Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M., Gregory, D., Johnson, M., and Bieniasz, P. (2009). Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139, 499-511.
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Züger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F., Uchil, P., Chatel, L., *et al.* (2011). TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472, 361-365.
- Peterlin, B., and Trono, D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature reviews Immunology* 3, 97-107.
- Piacentini, L., Biasin, M., Fenizia, C., and Clerici, M. (2009). Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. *Journal of internal medicine* 265, 110-124.
- Pietro Vernazza, B.H., Enos Bernasconi, Markus Flepp (2008). Les personnes séropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antirétroviral efficace ne transmettent pas le VIH par voie sexuelle. *Bulletin des médecins suisses* 89:5, 165-169.
- Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S., and Trono, D. (1999). The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunological reviews* 168, 51-63.
- Piguet, V., and Steinman, R. (2007). The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends in immunology* 28, 503-510.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* 15, 871-872.
- Poiesz, B., Ruscetti, F., Gazdar, A., Bunn, P., Minna, J., and Gallo, R. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 7415-7419.
- Poignard, P., Sabbe, R., Picchio, G., Wang, M., Gulizia, R., Katinger, H., Parren, P., Mosier, D., and Burton, D. (1999). Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* 10, 431-438.
- Popov, S., Chenine, A.-L., Gruber, A., Li, P.-L., and Ruprecht, R. (2005). Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells. *Journal of virology* 79, 602-608.
- Popovic, M., Sarngadharan, M., Read, E., and Gallo, R. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science (New York, NY)* 224, 497-500.
- Poulsen, A., Kvinesdal, B., Aaby, P., Mølbak, K., Frederiksen, K., Dias, F., and Lauritzen, E. (1989). Prevalence of and mortality from human immunodeficiency virus type 2 in Bissau, West Africa. *Lancet* 1, 827-831.
- Puigdomènech, I., Casartelli, N., Porrot, F., and Schwartz, O. (2013). SAMHD1 restricts HIV-1 cell-to-cell transmission and limits immune detection in monocyte-derived dendritic cells. *Journal of virology* 87, 2846-2856.

Puryear, W., Akiyama, H., Geer, S., Ramirez, N., Yu, X., Reinhard, B., and Gummuluru, S. (2013). Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS pathogens* 9.

Q, R

Quayle, A. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of reproductive immunology* 57, 61-79.

Quayle, A., Coston, W., Trocha, A., Kalams, S., Mayer, K., and Anderson, D. (1998). Detection of HIV-1-specific CTLs in the semen of HIV-infected individuals. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 161, 4406-4410.

Quiñones-Kochs, M., Buonocore, L., and Rose, J. (2002). Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. *Journal of virology* 76, 4199-4211.

Rappocciolo, G., Piazza, P., Fuller, C., Reinhart, T., Watkins, S., Rowe, D., Jais, M., Gupta, P., and Rinaldo, C. (2006). DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS pathogens* 2.

Rathore, A., Chatterjee, A., Sivarama, P., Yamamoto, N., Singhal, P., and Dhole, T. (2008). Association of RANTES -403 G/A, -28 C/G and In1.1 T/C polymorphism with HIV-1 transmission and progression among North Indians. *Journal of medical virology* 80, 1133-1141.

Reeves, J., and Doms, R. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology* 83, 1253-1265.

Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., *et al.* (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England journal of medicine* 361, 2209-2220.

Reynoso, R., Wieser, M., Ojeda, D., Bönisch, M., Kühnel, H., Bolcic, F., Quendler, H., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., and Quarleri, J. (2012). HIV-1 induces telomerase activity in monocyte-derived macrophages, possibly safeguarding one of its reservoirs. *Journal of virology* 86, 10327-10337.

Richardson, B. (2002). Nonoxynol-9 as a vaginal microbicide for prevention of sexually transmitted infections: it's time to move on. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 287, 1171-1172.

Richman, D., Wrin, T., Little, S., and Petropoulos, C. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4144-4149.

Roan, N., and Greene, W. (2007). A seminal finding for understanding HIV transmission. *Cell* 131, 1044-1046.

Robertson, D., Anderson, J., Bradac, J., Carr, J., Foley, B., Funkhouser, R., Gao, F., Hahn, B., Kalish, M., Kuiken, C., *et al.* (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science (New York, NY)* 288, 55-56.

Rolland, M., Tovnanubutra, S., deCamp, A., Frahm, N., Gilbert, P., Sanders-Buell, E., Heath, L., Magaret, C., Bose, M., Bradfield, A., *et al.* (2011). Genetic impact of vaccination on breakthrough HIV-1 sequences from the STEP trial. *Nature medicine* 17, 366-371.

Rothenberg, R., Scarlett, M., del Rio, C., Reznik, D., and O'Daniels, C. (1998). Oral transmission of HIV. *AIDS (London, England)* 12, 2095-2105.

S

Saba, E., Grivel, J.C., Vanpouille, C., Brichacek, B., Fitzgerald, W., Margolis, L., and Lisco, A. (2010). HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal immunology* 3, 280-290.

Sabatté, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., Salamone, G., Salomón, H., Amigorena, S., and Geffner, J. (2007). Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *Journal of virology* 81, 13723-13734.

Sagar, M., Akiyama, H., Etemad, B., Ramirez, N., Freitas, I., and Gummuluru, S. (2012). Transmembrane domain membrane proximal external region but not surface unit-directed broadly neutralizing HIV-1 antibodies can restrict dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. *The Journal of infectious diseases* 205, 1248-1257.

Sallé, B., Brochard, P., Bourry, O., Mannioui, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejuq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. *The Journal of infectious diseases* 202, 337-344.

Salzwedel, K., West, J., and Hunter, E. (1999). A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *Journal of virology* 73, 2469-2480.

Sánchez-Palomino, S., Massanella, M., Carrillo, J., García, A., García, F., González, N., Merino, A., Alcamí, J., Bofill, M., Yuste, E., *et al.* (2011). A cell-to-cell HIV transfer assay identifies humoral responses with broad neutralization activity. *Vaccine* 29, 5250-5259.

Sanders, R., de Jong, E., Baldwin, C., Schuitemaker, J., Kapsenberg, M., and Berkhout, B. (2002). Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *Journal of virology* 76, 7812-7821.

Saphire, A., Bobardt, M., Zhang, Z., David, G., and Galloway, P. (2001). Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *Journal of virology* 75, 9187-9200.

Sather, D., Armann, J., Ching, L., Mavrantoni, A., Sellhorn, G., Caldwell, Z., Yu, X., Wood, B., Self, S., Kalams, S., *et al.* (2009). Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 83, 757-769.

Sauter, D., Schindler, M., Specht, A., Landford, W., Münch, J., Kim, K.-A., Votteler, J., Schubert, U., Bibollet-Ruche, F., Keele, B., *et al.* (2009). Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell host & microbe* 6, 409-421.

Scanlan, C., Pantophlet, R., Wormald, M., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I., Katinger, H., Dwek, R., Rudd, P., and Burton, D. (2002). The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *Journal of virology* 76, 7306-7321.

Scheid, J., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T., Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., Velinzon, K., *et al.* (2011). Sequence and structural convergence of

broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science (New York, NY)* 333, 1633-1637.

Schnell, G., Joseph, S., Spudich, S., Price, R., and Swanstrom, R. (2011). HIV-1 replication in the central nervous system occurs in two distinct cell types. *PLoS pathogens* 7.

Shacklett, B. (2006). Understanding the "lucky few": the conundrum of HIV-exposed, seronegative individuals. *Current HIV/AIDS reports* 3, 26-31.

Shattock, R., and Moore, J. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature reviews Microbiology* 1, 25-34.

Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M., and Martin, M. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nature medicine* 5, 204-210.

Simek, M., Rida, W., Priddy, F., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D., Lehrman, J., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miuro, G., *et al.* (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *Journal of virology* 83, 7337-7348.

Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M., Saragosti, S., Georges-Courbot, M., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine* 4, 1032-1037.

Smed-Sörensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M., Andersson, J., Mascola, J., Spetz, A.-L., and Koup, R. (2005). Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Journal of virology* 79, 8861-8869.

Smith, B., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A., Stilianakis, N., Keele, B., Kerkering, T., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A., Tew, J., *et al.* (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 690-696.

Sokolskaja, E., Berthoux, L., and Luban, J. (2006). Cyclophilin A and TRIM5 α independently regulate human immunodeficiency virus type 1 infectivity in human cells. *Journal of virology* 80, 2855-2862.

Soriano, V., Gomes, P., Heneine, W., Holguín, A., Doruana, M., Antunes, R., Mansinho, K., Switzer, W., Araujo, C., Shanmugam, V., *et al.* (2000). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *Journal of medical virology* 61, 111-116.

Soulas, C., Conerly, C., Kim, W.-K., Burdo, T., Alvarez, X., Lackner, A., and Williams, K. (2011). Recently infiltrating MAC387(+) monocytes/macrophages a third macrophage population involved in SIV and HIV encephalitic lesion formation. *The American journal of pathology* 178, 2121-2135.

Spira, A., Marx, P., Patterson, B., Mahoney, J., Koup, R., Wolinsky, S., and Ho, D. (1996). Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *The Journal of experimental medicine* 183, 215-225.

Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D., and Mascola, J. (2009a). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nature medicine*.

Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D., and Mascola, J. (2009b). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nature medicine* *15*, 866-870.

Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F., and Katinger, H. (2001). A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS research and human retroviruses* *17*, 1757-1765.

Stoiber, H., Soederholm, A., Wilflingseder, D., Gusenbauer, S., Hildgartner, A., and Dierich, M. (2008). Complement and antibodies: a dangerous liaison in HIV infection? *Vaccine* *26 Suppl 8*, 85.

Stremlau, M., Owens, C., Perron, M., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* *427*, 848-853.

Stremlau, M., Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., and Sodroski, J. (2006). Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5 α restriction of HIV-1. *Virology* *351*, 112-120.

Su, B., Xu, K., Lederle, A., Peressin, M., Biedma, M., Laumond, G., Schmidt, S., Decoville, T., Proust, A., Lambotin, M., *et al.* (2012). Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood* *120*, 3708-3717.

Sugaya, M., Loré, K., Koup, R., Douek, D., and Blauvelt, A. (2004). HIV-infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4⁺ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *172*, 2219-2224.

Swingler, S., Mann, A., Zhou, J., Swingler, C., and Stevenson, M. (2007). Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophages is subverted by the viral envelope glycoprotein. *PLoS pathogens* *3*, 1281-1290.

T, U

Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptu, L., and Hayami, M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *Journal of virology* *73*, 6810-6820.

Taylor, B., Sobieszczyk, M., McCutchan, F., and Hammer, S. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England journal of medicine* *358*, 1590-1602.

Templeton, D., Jin, F., Prestage, G., Donovan, B., Imrie, J., Kippax, S., Cunningham, P., Kaldor, J., Mindel, A., Cunningham, A., *et al.* (2009). Circumcision and risk of sexually transmissible infections in a community-based cohort of HIV-negative homosexual men in Sydney, Australia. *The Journal of infectious diseases* *200*, 1813-1819.

Thèze, J., Chakrabarti, L., Vingert, B., Lambotte, O., and Delfraissy, J.-F. (2011). [Role of CD4 lymphocytes in the efficient immune response of HIV controllers]. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine* *195*, 545.

Tomaras, G., Yates, N., Liu, P., Qin, L., Fouda, G., Chavez, L., Decamp, A., Parks, R., Ashley, V., Lucas, J., *et al.* (2008). Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *Journal of virology* *82*, 12449-12463.

Towers, G., Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S., Luban, J., and Bieniasz, P. (2003). Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nature medicine* 9, 1138-1143.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Yasuda, S., Sugimoto, A., Yagi, T., Azuma, M., Yagita, H., Akagawa, K., and Takemori, T. (1997). Efficient virus transmission from dendritic cells to CD4⁺ T cells in response to antigen depends on close contact through adhesion molecules. *Virology* 239, 259-268.

Tudor Car, L., van-Velthoven, M., Brusamento, S., Elmoniry, H., Car, J., Majeed, A., and Atun, R. (2011). Integrating prevention of mother-to-child HIV transmission (PMTCT) programmes with other health services for preventing HIV infection and improving HIV outcomes in developing countries. The Cochrane database of systematic reviews.

Turville, S., Santos, J., Frank, I., Cameron, P., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stössel, H., Romani, N., Piatak, M., *et al.* (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170-2179.

Turville, S., Wilkinson, J., Cameron, P., Dable, J., and Cunningham, A. (2003). The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *Journal of leukocyte biology* 74, 710-718.

Urban, T., Weintrob, A., Fellay, J., Colombo, S., Shianna, K., Gumbs, C., Rotger, M., Pelak, K., Dang, K., Detels, R., *et al.* (2009). CCL3L1 and HIV/AIDS susceptibility. *Nature medicine* 15, 1110-1112.

V

Van Damme, L., Ramjee, G., Alary, M., Vuylsteke, B., Chandeying, V., Rees, H., Sirivongrangson, P., Mukenge-Tshibaka, L., Ettiègne-Traoré, V., Uaheowitchai, C., *et al.* (2002). Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 971-977.

van der Vlist, M., and Geijtenbeek, T. (2010). Langerin functions as an antiviral receptor on Langerhans cells. *Immunology and cell biology* 88, 410-415.

van Montfort, T., Nabatov, A., Geijtenbeek, T., Pollakis, G., and Paxton, W. (2007). Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4⁺ T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 3177-3185.

Van Rompay, K., Berardi, C., Dillard-Telm, S., Tarara, R., Canfield, D., Valverde, C., Montefiori, D., Cole, K., Montelaro, R., Miller, C., *et al.* (1998). Passive immunization of newborn rhesus macaques prevents oral simian immunodeficiency virus infection. *The Journal of infectious diseases* 177, 1247-1259.

Vasiliver-Shamis, G., Dustin, M., and Hioe, C. (2010). HIV-1 Virological Synapse is not Simply a Copycat of the Immunological Synapse. *Viruses* 2, 1239-1260.

Venkataraman, N., Cole, A., Svoboda, P., Pohl, J., and Cole, A. (2005). Cationic polypeptides are required for anti-HIV-1 activity of human vaginal fluid. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175, 7560-7567.

Vidal, N., Mulanga, C., Bazepeo, S., Lepira, F., Delaporte, E., and Peeters, M. (2006). Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *AIDS research and human retroviruses* 22, 182-187.

Virgin, H., and Walker, B. (2010). Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* 464, 224-231.

W

- Wainberg, M., and Albert, J. (2010). Can the further clinical development of bevirimat be justified? *AIDS (London, England)* 24, 773-774.
- Walker, B. (2007). Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA* 15, 134-136.
- Walker, L., Huber, M., Doores, K., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J.-P., Wang, S.-K., Ramos, A., Chan-Hui, P.-Y., Moyle, M., *et al.* (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477, 466-470.
- Walker, L., Phogat, S., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J., Wrinn, T., Simek, M., Fling, S., Mitcham, J., *et al.* (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science (New York, NY)* 326, 285-289.
- Wang, J.-H., Kwas, C., and Wu, L. (2009). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Journal of virology* 83, 4195-4204.
- Weinberg, A., Quiñones-Mateu, M., and Lederman, M. (2006). Role of human beta-defensins in HIV infection. *Advances in dental research* 19, 42-48.
- Welsch, S., Keppler, O., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J., and Kräusslich, H.-G. (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS pathogens* 3.
- White, T., Brandariz-Nuñez, A., Carlos Valle-Casuso, J., Amie, S., Nguyen, L., Kim, B., Brojatsch, J., and Diaz-Griffero, F. (2013). Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology* 436, 81-90.
- Wichukchinda, N., Nakayama, E., Rojanawiwat, A., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Vongsheree, S., Ariyoshi, K., Sawanpanyalert, P., and Shioda, T. (2006). Protective effects of IL4-589T and RANTES-28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS (London, England)* 20, 189-196.
- Wiley, R., and Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 738-743.
- Wilkins, A., Ricard, D., Todd, J., Whittle, H., Dias, F., and Paulo Da Silva, A. (1993). The epidemiology of HIV infection in a rural area of Guinea-Bissau. *AIDS (London, England)* 7, 1119-1122.
- Wu, X., Anderson, J., Campbell, E., Joseph, A., and Hope, T. (2006). Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7465-7470.
- Wu, X., Yang, Z.-Y., Li, Y., Hogerkorp, C.-M., Schief, W., Seaman, M., Zhou, T., Schmidt, S., Wu, L., Xu, L., *et al.* (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science (New York, NY)* 329, 856-861.

X, Y, Z

- Xiao, P., Zhao, J., Patterson, L., Brocca-Cofano, E., Venzon, D., Kozlowski, P., Hidajat, R., Demberg, T., and Robert-Guroff, M. (2010). Multiple vaccine-elicited nonneutralizing anti-envelope antibody activities contribute to protective efficacy by reducing both acute and chronic viremia following simian/human immunodeficiency virus SHIV89.6P challenge in rhesus macaques. *Journal of virology* 84, 7161-7173.
- Yagi, Y., Watanabe, E., Watari, E., Shinya, E., Satomi, M., Takeshita, T., and Takahashi, H. (2010). Inhibition of DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1 by Toll-like receptor 3 signalling in breast milk macrophages. *Immunology* 130, 597-607.
- Yamaguchi, J., Bodelle, P., Vallari, A., Coffey, R., McArthur, C., Schochetman, G., Devare, S., and Brennan, C. (2004). HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS research and human retroviruses* 20, 944-957.
- Yeni, P. (2006). Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH.
- Yu, H., Reuter, M., and McDonald, D. (2008). HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS pathogens* 4.
- Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C., Klaus-Kovtun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J., and Golding, H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature medicine* 3, 1369-1375.
- Zhu, J., and Paul, W. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.
- Zou, Z., Chastain, A., Moir, S., Ford, J., Trandem, K., Martinelli, E., Cicala, C., Crocker, P., Arthos, J., and Sun, P. (2011). Siglecs facilitate HIV-1 infection of macrophages through adhesion with viral sialic acids. *PloS one* 6.
- Zwick, M., Labrijn, A., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E., Binley, J., Moore, J., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D., *et al.* (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *Journal of virology* 75, 10892-10905.

Étude du transfert du VIH-1 des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4 primaires et inhibition par les anticorps neutralisants

Résumé

Les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) présentes dans les muqueuses comptent parmi les premières cibles du VIH-1 et participent à sa dissémination dans l'organisme.

Durant ma thèse, j'ai étudié le transfert du VIH des macrophages (M ϕ) et des cellules dendritiques (DCs) aux lymphocytes T. J'ai montré que ces APCs transfèrent efficacement le virus aux lymphocytes par le biais de différents mécanismes: transfert direct en *trans* dans les cocultures M ϕ /T, et transfert en *cis* (suite à la production de nouveaux virions) dans les DCs/T. Ces deux modes de transfert sont inhibés par les anticorps neutralisants (AcN). De manière intéressante, certains AcN anti-gp120 inhibaient plus efficacement le transfert du VIH dans les cocultures M ϕ /T que dans les cocultures DCs/T et l'infection des cellules T par le virus libre.

Ces résultats suggèrent que les APCs participent activement au transfert et à la dissémination du VIH et que les AcN sont capables d'inhiber ces différents modes de transfert.

Mots clés: VIH-1, anticorps neutralisants, cellules présentatrices d'antigènes, transfert de cellule-à-cellule.

Résumé en anglais

Antigen-presenting cells (APCs) present at mucosal sites are among the first HIV-1 target cells and contribute to the spread of infection.

During my thesis, I studied HIV transfer from macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DCs) to CD4-T lymphocytes. I showed that APCs were able to efficiently transfer HIV particles to lymphocytes, but through different mechanisms: M ϕ rapidly transferred HIV by direct *trans*-transfer, whereas DCs were mainly implicated in *cis*-transfer (after production of *de novo* HIV). Moreover, I have demonstrated that these two modes of transfer were inhibited by neutralizing antibodies (NAb) in both type of cocultures. Very interestingly, I showed that anti-gp120 NAb inhibit more efficiently HIV transfer in M ϕ /T than in DCs/T cocultures and T cells infection by free viral particles.

These findings highlight the major contributions of various mucosal target cells in HIV transfer and demonstrate the potent role of NAb on inhibition of cell-to-cell transfer.

Keywords: HIV-1, neutralizing antibodies, antigen-presenting cells, cell-to-cell transfer.