



**HAL**  
open science

# Etude des réponses T CD4+ et CD8+ induites chez l'homme par différentes stratégies vaccinales anti-VIH-1 utilisant des lipopeptides

Mathieu Surenaud

## ► To cite this version:

Mathieu Surenaud. Etude des réponses T CD4+ et CD8+ induites chez l'homme par différentes stratégies vaccinales anti-VIH-1 utilisant des lipopeptides. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2019. Français. NNT : 2019PESC0091 . tel-03466786

**HAL Id: tel-03466786**

**<https://theses.hal.science/tel-03466786>**

Submitted on 6 Dec 2021

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE** UNIVERSITÉ — PARIS-EST  
**Sciences de la Vie et de la Santé**

Ecole Doctorale 402 : Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire de recherche : INSERM U955, équipe 16  
Physiopathologie et immunothérapies dans l'infection VIH

## THÈSE

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université Paris-Est  
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

**Mathieu SURENAUD**

# Etude des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> induites chez l'homme par différentes stratégies vaccinales anti-VIH-1 utilisant des lipopeptides

Sous la direction du Dr Christine LACABARATZ et du Pr Jean-Daniel LELIEVRE

Thèse soutenue publiquement le 11 octobre 2019,

Devant le jury composé de :

Pr Yves LEVY  
Dr Sylvie LE GALL  
Dr Matthieu PERREAU  
Pr Guislaine CARCELAIN  
Dr Victor APPAY  
Pr Jean-Daniel LELIEVRE  
Dr Christine LACABARATZ

PU-PH, INSERM U955, IMRB, Créteil  
Assistant Professor, Ragon Institute, Cambridge  
Professeur assistant, CHUV, Lausanne  
PU-PH, INSERM U976, Hôpital Robert Debré, Paris  
DR, INSERM U1135, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris  
PU-PH, INSERM U955, IMRB, Créteil  
IR, INSERM U955, IMRB, Créteil

Président du jury  
Rapporteuse  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-directrice de thèse

*« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »*

Marie Curie

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information. »*

Albert Einstein

# **Remerciements**

Soutenir une thèse de science à 40 ans, voilà qui n'est pas très commun !

J'ai un souvenir lointain qui remonte à la surface, celui d'un jeune chercheur venu expliquer aux lycéens dont je faisais alors partie à l'époque la difficulté du parcours pour obtenir ce Bac+8, mais surtout la nécessité de pouvoir financer ces années d'études. A ce moment-là je me dis que le métier de chercheur ne sera pas pour moi...et que de toute façon je souhaite entrer rapidement dans la vie active. Alors je m'oriente vers le Brevet de Technicien Supérieur en Biotechnologie. Il faut déjà les financer ces 2 années près d'Orléans, loin de la famille. Puis après avoir réussi le concours d'entrée pour une année d'alternance en Bioexpérimentation industrielle à l'ESTBA à Paris, je ne fais pas partie des 20 premiers élèves signant un contrat d'apprentissage... Désillusion. Je m'apprête à pointer à Pôle Emploi mais grâce aux contacts noués lors de mon stage de 2<sup>ème</sup> année de BTS avec des personnes de l'Hôpital Saint-Vincent de Paul (Patricia Krief, Céline Igéa, Suzanne Figueiredo), et grâce au soutien financier de mes parents, je réalise finalement une année de spécialisation en recherche biomédicale dans l'unité INSERM U445 dirigée par le Dr Jean-Gérard Guillet, sous la direction du Dr Hanne Gahéry. C'est au sein de ce même laboratoire que je commence alors mon parcours professionnel en juillet 2000 avec un CDD de Technicien Supérieur à l'Hôpital Saint-Vincent de Paul, puis à Cochin. Je mets alors déjà les pieds dans le monde de la recherche vaccinale contre le SIDA.

Je souhaite continuer à évoluer et Hanne me donne alors l'opportunité de passer le diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes que j'obtiens en 2004 après avoir présenté mes travaux sur l'étude de la réponse immunitaire induite par un vaccin anti-VIH-1 lipopeptidique chez l'homme devant un jury composé du Pr Jean-Claude Gluckman et des docteurs Bruno Canque, Hanne Gahéry, Marie-Lyse Gougeon et Isabelle Bourgault. J'accède ensuite au grade d'Ingénieur d'Etudes, toujours en CDD.

Puis arrive malheureusement la disparition de Jean-Gérard en 2007. Hanne a des problèmes familiaux et le labo se retrouve dans une situation difficile. C'est à ce moment-là que je suis sollicité par le Dr Odile Launay, responsable du CIC de vaccinologie Cochin/Pasteur et par le Dr Jeannine Choppin, chercheuse dans notre équipe, pour participer à la rédaction d'un article sur la réponse immunitaire à long terme induite par un vaccin lipopeptidique anti-VIH-1 injecté par voie intramusculaire ou intradermique chez des volontaires sains. Je serai finalement co-premier auteur de cet article. Cela a été le déclic qui m'a fait penser à faire une thèse.

Je rejoins alors en 2009 l'équipe du Pr Yves Lévy à l'hôpital Mondor, sous la direction du Dr Christine Lacabaratz, toujours pour travailler sur des protocoles de vaccination anti-VIH-1 chez l'homme. Puis

## Remerciements

---

après plusieurs rencontres, après ma titularisation en janvier 2012, l'idée murît de réaliser cette thèse de science.

Si pour la majorité des étudiants, la thèse représente le début d'une carrière scientifique, pour moi elle représente finalement déjà l'aboutissement d'une première partie de ma vie scientifique. J'ai donc beaucoup de personnes à remercier, je vais certainement en oublier...j'espère qu'ils ou elles me pardonneront.

Si j'essaie de citer les personnes chronologiquement, je commencerai par mes parents qui m'ont toujours soutenu et me soutiennent encore dans mes choix. En particulier mon père pour l'effort financier que représentait cette année de spécialisation à Paris (ça valait le coup !) et ma mère pour les heures passées à venir donner un coup de main à ma femme pour garder João Henrique, Arthur et Heitor quand j'étais trop pris par ma thèse...ou le vélo (mais ça c'est une autre histoire !).

Ensuite, « le grand » Jean-Gérard Guillet ainsi qu'Hanne Gahery, Odile Launay et Jeannine Choppin de Cochin. Je n'oublierai pas Nadine, Thi, Angela (« la dream team du Foosa ») qui sont devenues bien plus que des collègues ! Je n'oublie pas non plus Suzanne et Bénédicte parmi les anciennes collègues de Cochin qui m'ont appris les techniques et formé à travailler en L2.

Concernant Mondor, je tiens à remercier tous les membres actuels de l'équipe 16 : PI, techniciens, étudiants...Je citerai tout d'abord les membres de la plateforme immunomonitoring avec qui je travaille au quotidien dans la bonne humeur. Une fois n'est pas coutume, je vais commencer par l'autre homme de l'équipe : Emile, alias le « king »...de la tarte à la rhubarbe ; bien entouré de Lydia « Life is Good » et Marion « FLMNH », sans oublier Corinne (Coco) bien sûr. En montant un peu dans la hiérarchie, je remercie également Aurélie, devenue « Madame Ebola », qui m'a formé à la cytométrie en flux...et bien sûr notre responsable Christine pour sa (toujours) grande disponibilité, pour avoir accepté de m'encadrer pour cette thèse malgré ses nombreuses responsabilités mais également accepté que je partage mon temps de travail entre mon activité de routine et ma thèse. Un grand merci Christine ! Je n'oublie pas non plus les personnes qui ont passé quelques mois ou quelques années sur la plateforme et en particulier mon ancien binôme : Céline. Je remercie également tous les autres membres de l'équipe 16 avec une pensée particulière pour mes 3 compagnons de galère, je veux bien entendu parler des autres thésards qui ont partagé les mêmes moments compliqués que moi cette année : Cindy, Jérôme et Lola. Merci également à Lylia pour sa gentillesse, toi c'était l'année dernière. Merci également à mes deux partenaires de danse (et oui il faut bien décompresser par moments) qui se reconnaîtront ! Je tiens à remercier également ma 2<sup>ème</sup> chef Sophie, responsable scientifique de la plateforme Luminex, avec qui les rapports sont toujours excellents : c'est très agréable de travailler avec toi Sophie ! J'espère qu'on pourra faire des choses

## Remerciements

---

sympas avec le SIMOA qui arrive. Merci également aux autres PI de l'équipe (Nabila, Véronique, Hakim, Sylvain, Michele) pour leurs conseils divers et variés...

...Je tiens à remercier également les nombreuses personnes ne faisant plus partie de l'équipe, dont certaines ont eu une influence positive sur mon choix de faire cette thèse, comme Ali, Matthieu et Ayrin notamment.

Je n'oublierai pas les autres collègues de l'IMRB, en particulier Aurélie, Adeline et Odile de la plateforme de cytométrie avec qui je partage la pause méridienne (presque) tous les jours, ni non plus les personnes du secrétariat général ou encore de l'école doctorale, notamment l'ancien directeur Alain Berdeaux qui a reçu favorablement ma demande d'effectuer une thèse.

Enfin concernant Mondor, je finirai par remercier Jean-Daniel pour avoir accepté de m'encadrer pendant ces 4 années de thèse et m'avoir laissé pas mal de libertés concernant les « manips ». Merci également pour nos discussions intéressantes qui me permettent parfois de relativiser les choses. Et puis je terminerai par remercier Yves, bien sûr, sans qui tout cela n'aurait jamais pu arriver. Merci Yves d'avoir cru en moi !

Outre les amis et la famille m'ayant également soutenu pendant ces 4 années que je tiens à remercier chaleureusement, je dois tirer un grand coup de chapeau à ma femme. En effet, ces derniers mois ont été très difficiles pour elle : gérer quasiment seule nos 3 enfants pendant que je partais m'enfermer dans la chambre pour écrire cette thèse ou que je passais les week-ends au labo. Merci encore à toi Tainara, ton soutien m'a vraiment été très important pour la fin de cette thèse, même si je n'ai pas forcément su te l'exprimer. « *Te amo borboleta meu* ». Maintenant je suis prêt à te renvoyer l'ascenseur si tu es toujours motivée à devenir expert-comptable !

# **Table des matières**

<b>Liste des figures</b>	<b>1</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>4</b>
<b>Avant-Propos</b>	<b>7</b>
<b>Introduction</b>	<b>8</b>
<b>Première partie : La réponse immunitaire antivirale</b>	<b>8</b>
I. Généralités sur le système immunitaire	8
II. La réponse innée antivirale	9
1. L'activation des cellules présentatrices de l'antigène	10
i. Les différents types de DC	11
ii. La sécrétion des interférons de type I	12
iii. Migration et maturation des cellules dendritiques	12
2. L'activation des NK	13
3. L'impact des autres cellules de l'immunité innée	14
III. La réponse adaptative antivirale	14
1. Les structures moléculaires reconnues par les récepteurs du système immunitaire adaptatif	15
i. Notion d'antigène et d'épitope	15
ii. Système HLA, apprêtement et présentation de l'antigène aux LT	16
iii. Le phénomène d'immunodominance	20
2. Les récepteurs du système immunitaire adaptatif	22
i. Le BCR et les Immunoglobulines	22
ii. Le TCR	25
3. Le ganglion : centre de la réponse immunitaire adaptative	27
4. Activation et différenciation des LB	28
5. Activation et différenciation des LT	29
6. Mise en place de la mémoire immunologique	35
<b>Deuxième partie : Physiopathologie et immunopathologie de l'infection par le VIH-1</b>	<b>38</b>
I. Généralités sur le VIH	38
1. Découverte du SIDA et de son agent étiologique le VIH	39
2. Origine et variabilité du VIH	40
3. Origine de la pandémie	44
4. Organisation génomique et structure du VIH-1	47
5. Cycle réplicatif du VIH-1	49
6. Tropisme et réservoir viral	50
7. Les différentes phases de l'infection	53
8. L'activation chronique induite par l'infection	57
9. Profils particuliers	59
II. Réponses immunitaires anti-VIH-1	60
1. La réponse immunitaire innée	61
i. Les CPA	62
ii. Les NK	62
iii. Les autres cellules de l'immunité innée	63
2. La réponse immunitaire adaptative	64
i. La réponse humorale	64
a. Cinétique d'apparition des anticorps	64
b. Les anticorps neutralisants	65
c. Les anticorps non-neutralisants	67
d. Les IgA	67
ii. La réponse T CD4 <sup>+</sup>	68

a. Réponse proliférative et cytokinique pendant la primo-infection	68
b. Réponse proliférative et cytokinique pendant la phase chronique	68
c. Réponse proliférative et cytokinique sous ART	70
d. Réponse cytotoxique	70
e. Réponse chimiokinique	71
iii. La réponse T CD8 <sup>+</sup>	72
a. Importance démontrée dans le modèle macaque	72
b. Réponse cytotoxique lors de la primo-infection	72
c. Réponse cytotoxique lors de la phase chronique	74
d. Réponse cytotoxique sous ART	77
e. Les molécules antivirales sécrétées par les LT CD8 <sup>+</sup>	77
<b>Troisième partie : Les vaccins anti-VIH</b>	<b>80</b>
I. Les stratégies de prévention non-vaccinale du VIH-1	80
1. Le préservatif	80
2. La circoncision	81
3. Les molécules antivirales	81
i. Sous forme locale	81
ii. Sous forme orale	81
4. Les anticorps neutralisants à large spectre	83
II. Le vaccin préventif	83
1. Quel objectif pour la communauté scientifique ?	83
2. Rétrospective historique	84
i. Les stratégies empiriques pionnières	84
ii. Les premières stratégies visant à induire des anticorps	85
iii. Les stratégies visant à induire des LT CD8 <sup>+</sup>	87
iv. L'essai Thaï RV144	90
3. Et maintenant ?	92
i. Les essais post-RV144	92
ii. Les stratégies actuelles visant à induire des bNAbs	92
iii. Les stratégies actuelles visant à induire des LT CD8 <sup>+</sup>	93
III. Le vaccin thérapeutique	94
1. VIH/SIDA : objectif guérison	94
2. Différentes stratégies vaccinales pour un vaccin thérapeutique anti-VIH-1	95
i. Rétrospective historique des stratégies « classiques »	95
ii. La stratégie lipopeptide	96
iii. La cellule dendritique : une cellule clé dans les stratégies vaccinales	98
a. DC targeting ex vivo	98
b. DC targeting in vivo	98
3. Les perspectives de guérison et d'éradication	99
i. L'éradication	100
ii. La cure fonctionnelle ou rémission à long terme	101
<b>Objectifs des travaux</b>	<b>103</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>105</b>
I. Description des différents candidats testés dans les essais vaccinaux analysés dans cette thèse	105
1. LIPO-6	105
2. LIPO-5	105
3. LIPO-6T	105
4. « LIPO-5-loaded DC »	106
5. vCP1433	107
6. MVA HIV-B	107
7. GTU-MultiHIV-B	108

II. Description des différents essais vaccinaux anti-VIH-1 analysés dans cette thèse _____	108
1. Les essais prophylactiques _____	108
2. Les essais thérapeutiques _____	110
III. Peptides utilisés pour la réalisation des tests immunologiques _____	116
<b>Résultats</b> _____	<b>118</b>
I. Première partie : Comparaison des réponses IFN $\gamma$ anti-VIH-1 induites par différentes stratégies vaccinales utilisant des lipopeptides _____	118
II. Deuxième partie : Epitope mapping de l'essai ANRS DALIA, article publié dans PLOS Pathogens ____	125
III. Troisième partie : L'induction des réponses IL-13 est spécifique de la vaccination lipopeptidique ____	158
IV. Quatrième partie : Comparaison des épitopes T CD8 <sup>+</sup> induisant une réponse IFN $\gamma$ anti-VIH-1 dans différents essais vaccinaux utilisant des lipopeptides _____	166
V. Cinquième partie : Comparaison des réponses T CD4 <sup>+</sup> anti-VIH-1 dans différents essais vaccinaux utilisant des lipopeptides _____	175
<b>Discussion</b> _____	<b>177</b>
I. Que conclure des réponses cellulaires induites par les lipopeptides ? _____	177
1. Les réponses T CD8 <sup>+</sup> _____	177
2. Les réponses T CD4 <sup>+</sup> _____	178
II. Quel bilan tirer des résultats des essais effectués avec les vaccins lipopeptidiques ? _____	179
III. Comment utiliser demain les lipopeptides ? _____	180
IV. Quelles sont les pistes pour améliorer les lipopeptides à l'avenir ? _____	181
1. Améliorer la construction des lipopeptides _____	181
2. Changer la voie d'immunisation _____	181
3. Amplifier l'effet adjuvant potentiel de la queue lipidique des lipopeptides _____	182
4. Revoir les séquences à inclure dans le vaccin _____	183
i. Remarques sur les séquences incluses dans LIPO-5 _____	183
ii. Intérêt des logiciels de prédictions épitopiques _____	184
iii. Choix des séquences pour un vaccin préventif _____	185
iv. Choix des séquences pour un vaccin thérapeutique _____	185
5. Combiner les interventions thérapeutiques _____	187
<b>Conclusion</b> _____	<b>188</b>
<b>Références bibliographiques</b> _____	<b>189</b>
<b>Annexes</b> _____	<b>224</b>
I. Annexe 1 : Revue « Development of an epitope-based HIV-1 vaccine strategy from HIV-1 lipopeptide to dendritic-based vaccines » _____	224
II. Annexe 2 : Article méthodologique « Optimization and evaluation of Luminex performance with supernatants of antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells » _____	242

# **Liste des figures**

<b>Figure 1 : Organisation générale du système immunitaire</b> .....	<b>9</b>
<b>Figure 2 : Phénotypes des différentes populations de DC humaines</b> .....	<b>11</b>
<b>Figure 3 : Les antigènes reconnus par l'immunité adaptative</b> .....	<b>15</b>
<b>Figure 4 : Structure des molécules du CMH de classe I et de classe II</b> .....	<b>16</b>
<b>Figure 5 : Illustration schématique de peptides se liant au sillon des molécules CMH de classe I (A) et de classe II (B)</b> .....	<b>17</b>
<b>Figure 6 : Apprêtement des antigènes et présentation classique et croisée par les molécules CMH de classe I et de classe II</b> .....	<b>18</b>
<b>Figure 7 : Voies intracellulaires de la présentation croisée dans les cellules dendritiques</b> .....	<b>19</b>
<b>Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'un anticorps</b> .....	<b>23</b>
<b>Figure 9 : Diversité combinatoire et fonctions des anticorps médiées par le Fc</b> .....	<b>24</b>
<b>Figure 10 : Description du TCR</b> .....	<b>25</b>
<b>Figure 11 : Positionnement des CDR du TCR à la surface du complexe CMH/peptide</b> .....	<b>26</b>
<b>Figure 12 : Organisation d'un ganglion lymphatique</b> .....	<b>27</b>
<b>Figure 13 : Activation et différenciation des LB naïfs en LB mémoires et plasmocytes</b> .....	<b>29</b>
<b>Figure 14 : La synapse immunologique</b> .....	<b>30</b>
<b>Figure 15 : Les différentes molécules activatrices ou inhibitrices du LT</b> .....	<b>31</b>
<b>Figure 16 : Polarisation et fonctions des lymphocytes T CD4<sup>+</sup></b> .....	<b>32</b>
<b>Figure 17 : Mécanismes employés par le CTL pour tuer les cellules infectées</b> .....	<b>33</b>
<b>Figure 18 : Réponses immunitaires antivirales primaire et secondaire</b> .....	<b>36</b>
<b>Figure 19 : Schéma des différentes zones de domiciliation et des voies de migration empruntées par les cellules T naïves et mémoires</b> .....	<b>37</b>
<b>Figure 20 : Le VIH-1 dérive de VIS circulants chez des chimpanzés et des gorilles de l'Afrique Centrale de l'Ouest</b> .....	<b>41</b>
<b>Figure 21 : Distribution globale des sous-types et recombinants du VIH-1 du groupe M</b> .....	<b>42</b>
<b>Figure 22 : Organisation du génome du VIH-1 et expression des gènes</b> .....	<b>47</b>
<b>Figure 23 : Structure du VIH-1</b> .....	<b>48</b>
<b>Figure 24 : Cycle réplcatif du VIH-1</b> .....	<b>49</b>
<b>Figure 25 : Les mécanismes de persistance du VIH-1 sous traitement antirétroviral</b> .....	<b>51</b>
<b>Figure 26 : Contribution des différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> au réservoir VIH-1 sous traitement antirétroviral</b> .....	<b>52</b>
<b>Figure 27 : Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1 non traitée et changements observés sous traitement antirétroviral</b> .....	<b>53</b>
<b>Figure 28 : La transmission du « transmitted/founder virus »</b> .....	<b>54</b>
<b>Figure 29 : Rôle de la pyroptose et de l'apoptose dans la mort des LT CD4<sup>+</sup> du tissu lymphoïde</b> .....	<b>56</b>
<b>Figure 30 : Facteurs associés à l'activation immunitaire induite par le VIH-1</b> .....	<b>58</b>
<b>Figure 31 : Stades de la primo-infection selon la classification de Fiebig</b> .....	<b>61</b>
<b>Figure 32 : Chronologie de l'immunité humorale anti-VIH-1</b> .....	<b>64</b>

<b>Figure 33 : Sites de vulnérabilité de l'enveloppe du VIH-1 ciblés par les principaux bNAbs identifiés</b> .....	<b>66</b>
<b>Figure 34 : Cinétique des mutations d'échappement viral aux réponses T CD8<sup>+</sup> lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1</b> .....	<b>73</b>
<b>Figure 35 : Les différents candidats vaccins pour un vaccin préventif anti-VIH-1</b> .....	<b>84</b>
<b>Figure 36 : Les récepteurs des DC candidats pour le DC targeting</b> .....	<b>99</b>
<b>Figure 37 : Représentation schématique de la partie lipidique (N<sup>ε</sup>-palmitoyl-L-lysine) des vaccins LIPO-6 / LIPO-5 / LIPO-6T</b> .....	<b>105</b>
<b>Figure 38 : Représentation schématique de la production du vaccin « LIPO-5-loaded DC »</b> .....	<b>106</b>
<b>Figure 39 : Carte génomique du vCP1433</b> .....	<b>107</b>
<b>Figure 40 : Représentation schématique du MVA HIV-B</b> .....	<b>107</b>
<b>Figure 41 : Représentation schématique du GTU-MultiHIV-B</b> .....	<b>108</b>
<b>Figure 42 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS VAC 04</b> .....	<b>109</b>
<b>Figure 43 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS VAC 18</b> .....	<b>109</b>
<b>Figure 44 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS VRI 01</b> .....	<b>110</b>
<b>Figure 45 : Schéma vaccinal de l'essai LIPATHERA</b> .....	<b>111</b>
<b>Figure 46 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS 093</b> .....	<b>112</b>
<b>Figure 47 : Schéma vaccinal de l'essai DCV-2 / MANON07 ORVACS</b> .....	<b>113</b>
<b>Figure 48 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS DALIA</b> .....	<b>114</b>
<b>Figure 49 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS LIGHT</b> .....	<b>114</b>
<b>Figure 50 : Pools de peptides 15-mers et séquences vaccinales des principaux vaccins utilisés dans les essais ANRS</b> .....	<b>117</b>
<b>Figure 51 : Réponses ELISpot détectées après 18h ou 42h de stimulation avec le maxipool Gag chez 6 patients de l'essai DALIA</b> .....	<b>159</b>
<b>Figure 52 : Présence des épitopes T CD8<sup>+</sup> induisant une réponse au sein des différentes régions de LIPO-5</b> .....	<b>172</b>

# **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Estimation de la probabilité par acte d’acquérir le VIH à partir d’une source infectée .....	38
Tableau 2 : Principaux corrélats de contrôle de la réplication virale par les LT CD4 <sup>+</sup> anti-VIH-1.....	71
Tableau 3 : Principaux corrélats de contrôle de la réplication virale par les LT CD8 <sup>+</sup> anti-VIH-1.....	79
Tableau 4 : Essais cliniques de vaccins préventifs anti-VIH-1 de phase IIb/III.....	86
Tableau 5 : Principaux corrélats de protection retrouvés dans les différents essais d’efficacité anti-VIH-1.....	91
Tableau 6 : Essais cliniques visant à l’éradication ou la cure fonctionnelle du VIH-1.....	102
Tableau 7 : Description des séquences peptidiques de LIPO-6 / LIPO-5 / LIPO-6T.....	106
Tableau 8 : Description des différents essais cliniques analysés au cours de cette thèse.....	115
Tableau 9 : Conservation des séquences de LIPO-5 parmi les différents sous-types du VIH-1.....	119
Tableau 10 : Induction des réponses IFN $\gamma$ détectées par test ELISpot chez les volontaires de l’essai prophylactique ANRS VRI.....	121
Tableau 11 : Induction des réponses IFN $\gamma$ détectées par test ELISpot chez les volontaires des essais thérapeutiques ANRS DALIA, ANRS 093 et LIGHT.....	121
Tableau 12 : Corrélations (Spearman) entre l’intensité des réponses ELISpot après vaccination et la charge virale maximale pendant l’ATI chez 6 patients de l’essai ANRS DALIA.....	159
Tableau 13 : Corrélations (Spearman) entre l’intensité des réponses ELISpot après vaccination et la charge virale maximale pendant l’ATI chez tous les patients de l’essai ANRS DALIA.....	160
Tableau 14 : Résultats des tests ELISpot IL-13 réalisés dans différents essais thérapeutiques anti-VIH-1.....	162
Tableau 15 : Résultats des tests ELISpot IL-13 réalisés dans différents essais prophylactiques anti-VIH-1.....	162
Tableau 16 : Résultats des tests ELISpot IL-13 réalisés dans l’essai ANRS VAC 18 en fonction de la dose vaccinale injectée .....	165
Tableau 17 : Bilan des réponses ELISpot IL-13.....	165
Tableau 18 : Epitopes T CD8 <sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l’essai ANRS VAC 04.....	167
Tableau 19 : Epitopes T CD8 <sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l’essai LIPHTERA.....	168
Tableau 20 : Epitopes T CD8 <sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l’essai ANRS 093.....	168
Tableau 21 : Epitopes T CD8 <sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l’essai DALIA.....	169
Tableau 22 : Identification des épitopes T CD8 <sup>+</sup> immunodominants et sous-dominants en fonction des molécules HLA chez les volontaires sains et les patients VIH+.....	171
Tableau 23 : Identification des épitopes T CD8 <sup>+</sup> immunodominants et sous-dominants en fonction des régions vaccinales chez les volontaires sains et les patients VIH+.....	172
Tableau 24 : Fréquence des allèles des molécules HLA-A et HLA-B en France.....	174
Tableau 25 : Immunodominance des réponses T CD4 <sup>+</sup> chez des volontaires sains et des patients VIH+ vaccinés participant à différents essais vaccinaux anti-VIH-1.....	175

# **Liste des abréviations**

## Liste des abréviations

---

Ad : adénovirus

ADCC : « antibody dependent cellular cytotoxicity »

ADCD : « antibody dependent complement deposition »

ADCDC : « antibody dependent complement dependent cytotoxicity »

ADCP : « antibody dependent cellular phagocytosis »

ADN : acide désoxyribonucléique

ANRS : Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales ou France Recherche Nord&Sud  
Sida-HIV hépatites

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ART : thérapie antirétrovirale

ATI : « analytical treatment interruption »

BCR : « B-cell receptor »

bNAbs : « broad neutralizing antibodies » ou anticorps neutralisants à large spectre

CAF : « CD8 antiviral factor »

CCL : « CC chemokine ligand »

CCR : « CC chemokine receptor »

CDC : « center for disease control and prevention »

CDR : « complementarity determining regions »

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CPA : cellules présentatrices de l'antigène

CRF : forme recombinante circulante

CTL : lymphocyte T cytotoxique

CTLA-4 : « cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein 4 »

CXCR : « CXC chemokine receptor »

DC : cellule dendritique

DC-SIGN : « dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin »

EBV : « Epstein-Barr virus »

EC : « elite controller »

ELISpot : « enzyme-linked immunospot »

Env : enveloppe

Fab : « antigen binding fragment »

Fas : « apoptosis-stimulating fragment »

FasL : Fas ligand

Fc : « crystallizable fragment »

FDC : cellule folliculaire dendritique

Gag : « group specific antigens »

GALT : « Gut associated lymphoid tissue » ou tissus lymphoïdes associés au tube digestif  
gp : glycoprotéine  
HESN : « highly exposed seronegative subjects »  
HIVR4P : « HIV research for prevention »  
HLA : « human leucocyte antigen »  
HPTN : « HIV prevention trials network »  
HTL : lymphocyte T « helper » ou auxiliaire  
HVTN : « HIV vaccine trials network »  
ICOS : « Inducible T-cell costimulator »  
ICS : « intracellular cytokine staining »  
IFN : interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IL : interleukine  
ILC : « innate lymphoid cell »  
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
KIR-L : « Killer Immunoglobulin-like Receptors-Long »  
KIR-S : « Killer Immunoglobulin-like Receptors-Short »  
LAG3 : « lymphocyte activation gene 3 »  
LB : lymphocyte B  
LPS : lipopolysaccharide  
LT : lymphocyte T  
LT<sub>CM</sub> : lymphocyte T mémoire central  
LT<sub>EM</sub> : lymphocyte T mémoire effecteur  
LT<sub>EMRA</sub> : lymphocyte T mémoire effecteur très différencié  
LT<sub>RM</sub> : lymphocyte T mémoire résident des tissus non lymphoïdes  
LT<sub>TM</sub> : lymphocyte T mémoire transitionnel  
LTNP : « long-term non progressor »  
MAIT : « mucosal associated invariant T cell »  
mDC : cellule dendritique myéloïde  
MIP : « macrophage inflammatory protein »  
MVA : « modified vaccinia Ankara »  
Nef : « negative regulatory factor »  
NK : « natural killer »  
NKT : « natural killer T cell »  
PAMP : « pathogen-associated molecular patterns »  
PD1 : « programmed cell death 1 »  
pDC : « plasmacytoid dendritic cell »  
PD-L1 : « programmed death-ligand 1 »

## Liste des abréviations

---

Pol : polymérase

PRR : « pattern-recognition receptors »

PTC : « post-treatment controller »

RANTES : « regulated on activation, normal T cell expressed and secreted »

Rev : « regulator of expression of virion proteins »

RP : « rapid progressor »

RT : « reverse transcriptase » ou transcriptase inverse

SDF-1 : « stromal cell-derived factor 1 »

SFC : « spot forming cells »

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

T/F : « transmitted / founder »

TAP : « transporter associated with antigen processing »

Tat : « transactivator of transcription »

TCR : « T-cell receptor »

TFH : cellule T folliculaire « helper »

Th : T « helper »

TIM3 : « T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3 »

TLR : « toll-like receptors »

TNF : « tumor necrosis factor »

Treg : lymphocyte T régulateur

Vif : « virion infectivity factor »

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : virus de l'immunodéficience simienne

Vpr : « viral protein r »

Vpu : « viral protein u »

VRI : « Vaccine Research Institute »

VZV : « varicella zooster virus » ou virus de la varicelle et du zona

# **Avant-Propos**

Même si en 2016 le VIH/SIDA ne faisait plus partie des 10 principales causes de mortalité dans le monde, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à 1 million le nombre de personnes décédées de maladies liées au SIDA en 2016, soit approximativement une personne toutes les 30 secondes. Depuis le début de l'épidémie, c'est plus de 77 millions de personnes qui ont été infectées par le VIH et 35,4 millions en sont mortes. En 2017, plus de 70% des décès liés au SIDA sont concentrés en Afrique Subsaharienne ([ONUSIDA, 2018](#)).

Malgré un taux de nouvelles infections qui a baissé de 47% depuis le pic de 1996, l'ONUSIDA estime encore à 1,8 million le nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH en 2017. Il faut donc avoir en tête que toutes les 20 secondes une nouvelle personne s'infecte par le VIH dans le monde. Ainsi, en 2017, 36,9 millions de personnes vivent avec le VIH, dont plus de 53% en Afrique de l'Est et du Sud. Ces données justifient donc amplement la recherche d'un vaccin prophylactique contre le VIH.

Parmi les personnes vivant avec le VIH en 2017, 75% connaissent leur statut et seulement 59% ont accès à la thérapie antirétrovirale, ce qui justifie donc également la recherche d'un vaccin thérapeutique contre le VIH.

C'est dans ce contexte que j'ai réalisé cette thèse de sciences au sein de l'équipe 16 de l'INSERM U955 dirigée par le Pr Lelièvre, plus particulièrement au sein de la plateforme cellulaire dirigée par le Dr Lacabaratz, qui est notamment impliquée dans l'immunomonitoring d'essais vaccinaux prophylactiques et thérapeutiques anti-VIH-1. En effet, avec les autres membres du « Vaccine Research Institute » (VRI) créé en 2011 et dirigé par le Pr Yves Lévy, ce laboratoire évalue l'immunogénicité de candidats vaccins développés par l'ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites) ou d'autres collaborateurs.

Cette thèse me tient particulièrement à cœur car avec mon profil singulier (Ingénieur d'Etudes statutaire depuis 2012 après plus de 11 ans de CDD) cela fait maintenant plus de 19 ans que je travaille sur les vaccins lipopeptidiques anti-VIH-1 développés par l'ANRS.

# **Introduction**

## **Première partie : La réponse immunitaire antivirale**

### **I. Généralités sur le système immunitaire**

Toutes les espèces animales sont confrontées quotidiennement à des agressions provenant de micro-organismes potentiellement dangereux. On distingue quatre grandes catégories d'agents pathogènes qui sont les bactéries, les virus, les parasites et les champignons. Pour lutter contre l'infection (invasion) par ces pathogènes, l'homme a développé un système immunitaire complexe composé d'un ensemble d'organes et de tissus, de cellules et de molécules, qui concourent à opposer une résistance aux infections en induisant une réponse immunitaire. Chez les vertébrés, le système immunitaire est constitué de deux bras qui agissent en interaction très étroite : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée ou naturelle correspond à une réponse constitutive d'action immédiate (réponse inflammatoire). Elle repose sur des mécanismes humoraux (complément, cytokines, protéines de la phase aiguë de l'inflammation...) et cellulaires (cellules à fonction phagocytaire ou lytique) faisant une distinction globale du soi et du non-soi. L'immunité adaptative ou acquise est une réponse plus tardive (après 96 heures) mais spécifique de l'antigène du fait que les lymphocytes (cellules de l'immunité adaptative) possèdent un seul type de récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique ou épitope.

Avant toute mise en action du système immunitaire, il existe d'abord un ensemble de barrières permettant à l'organisme de limiter les infections, il s'agit de l'anté-immunité. Ces barrières sont d'ordres :

- mécaniques : jonctions serrées maintenant efficacement l'étanchéité des cellules épithéliales tapissant les surfaces corporelles ; mucus produit par les épithéliums internes défavorisant l'adhésion des micro-organismes ; mouvements ciliaires des muqueuses respiratoires limitant la colonisation des pathogènes,

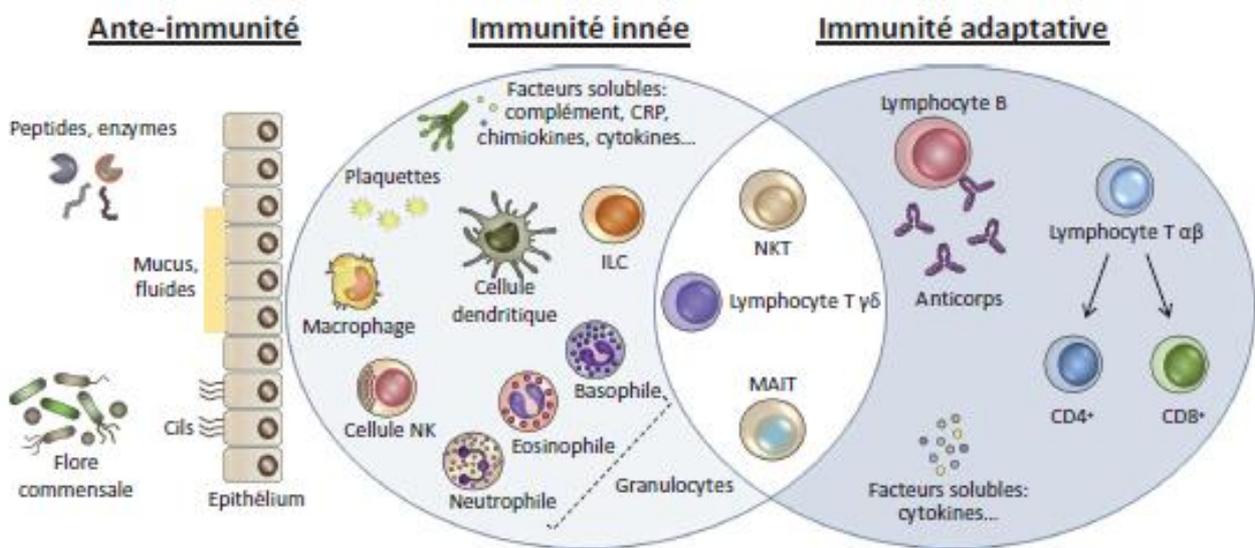
- chimiques : pH acide de la peau, de l'estomac ou des muqueuses vaginales ; production de peptides et protéines antimicrobiens au niveau des yeux, de la peau, des voies digestives, respiratoires, urinaires et génitales,

- écologiques : flore commensale (ou microbiote) cutanée, respiratoire, intestinale ou encore vaginale empêchant l'installation et le développement de potentiels pathogènes.

Concernant les cellules immunitaires, elles sont toutes issues d'un précurseur commun : la cellule souche hématopoïétique pluripotente, située dans la moelle osseuse. A partir de cette cellule sont générées des cellules souches myéloïdes et lymphoïdes. Les cellules souches myéloïdes donnent naissance aux granulocytes, aux monocytes/macrophages ainsi qu'aux cellules dendritiques myéloïdes (mDC) alors que les cellules souches lymphoïdes donnent naissance aux lymphocytes T

(LT), lymphocytes B (LB), NK (« Natural Killers »), NKT (« Natural Killer T cells »), ILC (« Innate Lymphoid Cells »), MAIT (« Mucosal associated invariant T cells »), ainsi qu'aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules, qui sont généralement classées en cellules de l'immunité innée et cellules de l'immunité adaptative (**Figure 1**), sont présentes dans divers organes mais également dans la circulation sanguine afin de pouvoir migrer rapidement vers le site d'infection. Des cellules ayant d'autres fonctions telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou même les plaquettes peuvent également jouer un rôle dans la réponse immunitaire ([Collège des Enseignants d'Immunologie, 2018](#)).

En plus des acteurs de type cellulaire, le système immunitaire comprend de nombreuses molécules solubles présentes dans la circulation, dans les espaces extracellulaires ou associées aux membranes. Parmi elles, le système du complément joue un rôle primordial dans la défense contre les microbes. Les cytokines, substances solubles de signalisation cellulaire, constituent un extraordinaire système de communication entre les cellules. Enfin les chimiokines, qui sont des cytokines chimiotactiques, permettent le recrutement et la migration des cellules dans des sites spécifiques de l'organisme.



**Figure 1 : Organisation générale du système immunitaire**

*D'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.*

## II. La réponse innée antivirale

Après avoir pénétré dans notre organisme par la peau, la conjonctive, la voie sanguine, respiratoire ou génitale, les virus vont déclencher l'activation du complément (qui représente environ 5% de

l'ensemble des protéines plasmatiques) et des cellules de l'immunité innée. L'activation du complément ne sera pas détaillée ici mais elle permet de lutter contre les infections par plusieurs moyens : en favorisant la phagocytose (capacité des cellules de l'immunité innée à pouvoir ingérer et digérer des particules, des micro-organismes ou des cellules endommagées) en recouvrant la surface de l'agent pathogène (opsonisation), en permettant le recrutement de cellules sécrétrices de cytokines pro-inflammatoires, en détruisant directement l'agent infectieux par lyse osmotique, ou encore en modulant la réponse immunitaire adaptative.

### **1. L'activation des cellules présentatrices de l'antigène**

Les cellules de l'immunité innée qui sont douées de phagocytose sont appelées cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et sont particulièrement impliquées suite à une infection virale. En effet, les monocytes/macrophages ou encore les neutrophiles vont phagocyter les virus ainsi que les cellules mortes ou infectées, et permettre en même temps que leur élimination la présentation de leurs antigènes aux LT (qui sont avec les LB les principaux acteurs de l'immunité adaptative). Une des populations clés parmi ces cellules de l'immunité innée est la famille des DC, en particulier les mDC dites CPA professionnelles car ce sont les seules capables d'activer des LT naïfs (n'ayant pas encore rencontré d'antigène exogène). Ces cellules sentinelles réparties dans tout l'organisme vont faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative ([Banchereau and Steinman, 1998](#)).

Les virus vont être reconnus comme non-soi par les cellules de l'immunité innée, essentiellement les DC, car elles possèdent des récepteurs nommés PRR (« pattern-recognition receptors ») reconnaissant des structures moléculaires que l'on retrouve chez de nombreux pathogènes, les PAMP (« pathogen-associated molecular patterns ») ([Janeway, 1989](#)). Parmi les différents PRR découverts et caractérisés, les virus peuvent être détectés par les TLR (« Toll-like receptors »), les RLR (« RIG-I-like receptors »), et les CDS (« cytosolic DNA sensors »). En effet, les acides nucléiques (acide désoxyribonucléique (ADN) ou acide ribonucléique (ARN)) des virus sont reconnus par les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9, localisés dans les vésicules intracellulaires. Les protéines virales d'enveloppe sont quant à elles reconnues par les TLR2, TLR4, et TLR13, localisés à la surface des cellules. Les ARN et ADN viraux sont également détectés dans le cytoplasme des cellules infectées par la famille des RLR et des CDS, respectivement ([Kumar et al., 2009](#)).

**i. Les différents types de DC**

Les cellules dendritiques (DC) ont été décrites pour la première fois par Steinman et Cohn en 1973 (Steinman and Cohn, 1973). Elles constituent une famille de cellules hétérogènes par leur morphologie, leur phénotype (Figure 2), leur fonction, leur localisation et leur origine hématopoïétique (Merad et al., 2013). D’ailleurs, les cellules de Langerhans, qui avaient déjà été décrites en 1868, appartiennent à cette famille et sont les DC de l’épiderme. Comme expliqué précédemment, les mDC sont spécialisées dans la capture, le transport, l’apprêtement et la présentation des antigènes aux LT. En plus des PRR, ces cellules possèdent des récepteurs favorisant la phagocytose comme les récepteurs de mannose, les récepteurs de la famille des lectines de type C, des récepteurs pour les corps apoptotiques ou encore les récepteurs pour le fragment constant des Immunoglobulines (FcR).

						
<b>Phénotype :</b>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>low</sup> CD1a <sup>-</sup> CD123 <sup>hi</sup> BDCA2 <sup>+</sup> BDCA4 <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> BDCA1 <sup>+</sup> BDCA3 <sup>+/-</sup> CD11b <sup>low</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> BDCA1 <sup>-</sup> BDCA3 <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> CD141 <sup>+</sup> Necl2 <sup>+</sup> Xcr1 <sup>+</sup> Clec9a <sup>+</sup> Dec205 <sup>hi</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> BDCA1 <sup>+</sup> Langerin <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> Sirpa <sup>+</sup> CD11b <sup>+/-</sup> E-cadherin <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> BDCA1 <sup>+</sup> Langerin <sup>-</sup> EpCAM <sup>-</sup> DC-SIGN <sup>+</sup> FXIIIa <sup>-</sup> CD163 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> BDCA1 <sup>+</sup> Langerin <sup>-</sup> EpCAM <sup>-</sup> Sirpa <sup>+</sup> CD11b <sup>hi</sup>
<b>PRR :</b>	TLR1 <sup>+</sup> , TLR2 <sup>-</sup> , TLR3 <sup>-</sup> , TLR4 <sup>-</sup> , TLR6 <sup>+</sup> , TLR7 <sup>+</sup> , TLR8 <sup>-</sup> , TLR9 <sup>+</sup>	ND	TLR1 <sup>+</sup> , TLR2 <sup>+</sup> , TLR3 <sup>+</sup> , TLR4 <sup>-</sup> , TLR6 <sup>+</sup> , TLR7 <sup>-</sup> , TLR8 <sup>+</sup> , TLR9 <sup>-</sup>	TLR1 <sup>+</sup> , TLR2 <sup>+</sup> , TLR3 <sup>lo</sup> , TLR4 <sup>-</sup> , TLR6 <sup>+</sup> , TLR7 <sup>-</sup> , TLR8 <sup>-</sup> , TLR9 <sup>-</sup>	ND	ND
<b>Equivalent murin :</b>	pDC	cDC	CD8 <sup>+</sup> cDC	LC	ND	Dermal DC
<b>Lieu :</b>	Sang et tissu lymphoïde			Epiderme / Derme Tissu cutané		

**Figure 2 : Phénotypes des différentes populations de DC humaines**

Modifié d’après Merad et al., 2013. LC, cellule de Langerhans ; ND, non déterminé ; PRR, « pattern- recognition receptors ».

### ***ii. La sécrétion des interférons de type I***

La reconnaissance des PAMP par les différents PRR entraîne rapidement une série de réponses immunitaires antivirales innées par l'induction de cytokines pro-inflammatoires comme le « tumor necrosis factor » (TNF) $\alpha$ , l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-15, de chimiokines (CXCL-8) et d'interférons (IFN) de type I qui facilitent l'éradication du pathogène, mais initient également le développement de la réponse immunitaire adaptative. Il est important de préciser ici que les PRR comme les TLR sont également exprimés par d'autres cellules immunitaires comme les LB mais également par des cellules non-immunitaires comme les cellules épithéliales situées au niveau des différentes voies d'entrées des pathogènes, ou encore les cellules endothéliales constituant la couche interne des vaisseaux sanguins (Sandor and Buc, 2005). L'infection de ces différentes cellules et donc l'activation des TLR entraîne alors la sécrétion d'IFN de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) induisant la transcription des ISG (« Interferon Stimulated Genes »), permettant notamment d'activer des enzymes antivirales capables de dégrader les ARN messagers (ARNm) des virus et d'inhiber la synthèse des protéines virales (Goodbourn et al., 2000). En plus de leurs multiples activités antivirales, les IFN de type I ont des effets immuno-régulateurs puisqu'ils sont également capables d'induire la synthèse de protéines impliquées dans l'apprêtement et la présentation des antigènes viraux aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL), ils activent les cellules NK et les LB, et ils prolongent la survie des LT. Cependant, en cas d'infections virales chroniques, les IFN de type I peuvent participer à la génération de LT CD8<sup>+</sup> dysfonctionnels (Crouse et al., 2015). Les pDC sont particulièrement impliquées dans la sécrétion des IFN de type I.

### ***iii. Migration et maturation des cellules dendritiques***

Après avoir capturé des antigènes sous leur forme immature, les DC vont subir un processus de maturation et de migration. Le processus de maturation comprend plusieurs événements coordonnés : des changements de morphologie, de cytosquelette et de mobilité, la perte de la capacité de phagocytose/endocytose et de sécrétion des chimiokines, la surexpression des molécules de costimulation et d'adhérence, la translocation des complexes CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)/peptide à la surface de la cellule, et la sécrétion de cytokines impliquées dans la polarisation de la réponse immunitaire. En effet, la maturation des DC est associée à la diminution d'expression des récepteurs de chimiokines inflammatoires et à l'expression *de novo* de CCR7. Ce récepteur reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21 qui sont sécrétées dans les zones riches en LT des organes lymphoïdes secondaires. Les DC quittent alors les tissus inflammatoires et entrent dans

la circulation lymphatique qui les conduit vers les ganglions lymphatiques de drainage où elles vont présenter les antigènes aux LT.

## 2. L'activation des NK

Les cellules NK vont agir de deux manières différentes suite à une infection virale. D'une part les NK vont reconnaître et lyser les cellules infectées par un mécanisme dépendant de la sécrétion de molécules cytotoxiques (perforine et granzymes) contenues dans leurs granules cytolitiques. L'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  sécrétés par les cellules de l'immunité innée et par les cellules infectées vont d'ailleurs augmenter la cytotoxicité des NK. D'autre part, les NK vont sécréter en grande quantité de l'IFN $\gamma$  ayant une action antivirale mais permettant également de promouvoir la réponse adaptative par différents mécanismes. La sécrétion d'IFN $\gamma$  par les NK est induite notamment par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 sécrétées par les cellules de l'immunité innée et les cellules infectées (Biron et al., 1999; Paolini et al., 2015). Le rôle antiviral important des NK a été démontré chez l'homme par la survenue d'infections virales sévères, notamment par les virus de la famille des herpesviridae, en cas de déficience en cellules NK (Orange, 2013).

Les cellules NK sont capables d'éliminer rapidement les cellules infectées par un pathogène intracellulaire tout en ignorant les cellules saines grâce à leurs nombreux récepteurs inhibiteurs et activateurs qui exercent leur fonction (inhibitrice ou activatrice) lorsqu'ils reconnaissent leurs ligands sur les cellules cibles. En effet, les NK reconnaissent certaines molécules du soi : les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), encore appelé « human leucocyte antigen » (HLA) chez l'homme, grâce à des récepteurs inhibiteurs ; et des molécules de stress grâce à des récepteurs activateurs. L'intégration de la somme des signaux activateurs et inhibiteurs transmis par les récepteurs régule l'activation de la cellule NK suite à son interaction avec une cellule cible. La résultante de ces signaux détermine si la cellule NK va exercer ou non ses fonctions de cytotoxicité et/ou de sécrétion de cytokines vis-à-vis de la cellule cible.

Les principaux récepteurs inhibiteurs sont les KIR-L (« Killer Immunoglobulin-like Receptors-Long ») et NKG2A (lectine de type C). Les KIR-L reconnaissent les molécules HLA de classe I HLA-C1, HLA-C2, HLA-Bw4 et HLA-A3/A11 tandis que l'hétérodimère CD94/NKG2A reconnaît les molécules de classe Ib (dites non classiques) HLA-E (Jost and Altfeld, 2013).

Les principaux récepteurs activateurs sont les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) qui comprennent NKp30, NKp44 et NKp46 ; les KIR-S (« Killer Immunoglobulin-like Receptors-Short ») et les lectines de type C NKG2C, NKG2D, NKG2E. Les nombreux ligands des NCR ne sont encore pas tous connus, cependant des molécules associées aux tumeurs ainsi que certaines protéines d'origine

virale ont été identifiées (Barrow et al., 2019). Les KIR-S reconnaissent les molécules HLA-C1, HLA-C2 et HLA-Cw4 ; les hétérodimères CD94/NKG2C et CD94/NKG2E reconnaissent les molécules HLA-E alors que NKG2D reconnaît des molécules exprimées par des cellules stressées (Jost and Altfeld, 2013).

Ces dernières années, la mise en évidence de caractéristiques de l'immunité adaptative chez les NK comme l'induction d'une réponse spécifique de l'antigène, l'expansion clonale, l'auto-renouvellement, ou encore la réponse secondaire à une stimulation antigénique, a changé la vision que l'on pouvait avoir des NK (Adams et al., 2016; Paust et al., 2017) et introduit le concept de mémoire innée ou « innate memory ». De plus, il est maintenant bien établi que les NK peuvent réguler les réponses adaptatives T *via* la sécrétion de cytokines ou encore par les interactions avec leurs récepteurs, comme NKG2D et NKp46 qui peuvent contrôler la lyse des LT par les NK (Crome et al., 2013).

### **3. L'impact des autres cellules de l'immunité innée**

D'autres acteurs cellulaires de l'immunité innée sont également impliqués dans l'immunité antivirale comme les ILC qui vont produire de l'IFN $\gamma$ , ou encore les NKT et les MAIT impliqués dans la sécrétion d'IFN $\gamma$  mais également responsables d'une réponse cytotoxique par un relargage de granzymes et de perforine.

## **III. La réponse adaptative antivirale**

Contrairement à d'autres agents infectieux, les virus n'ont pas de potentiel propre de multiplication. Ils ont besoin d'introduire leur matériel génétique dans des cellules vivantes afin d'utiliser leur machinerie transcriptionnelle pour se répliquer. Ce sont donc des parasites intracellulaires obligatoires. Les virus sont cependant détectés de deux manières distinctes par les cellules de l'immunité adaptative : d'une part comme antigènes particuliers complexes (la particule virale), d'autre part sous forme de cellules infectées exprimant des antigènes membranaires viraux.

Les acteurs de la réponse immunitaire adaptative antivirale sont principalement les LB responsables de la réponse humorale (production d'anticorps), et les LT responsables de la réponse cellulaire (auxiliaire, cytotoxique ou régulatrice). Ils sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes *via* leurs récepteurs de type BCR (« B-cell receptor ») ou TCR (« T-cell receptor ») qui sont composés de chaînes protéiques permettant la reconnaissance de l'antigène et la transduction du signal

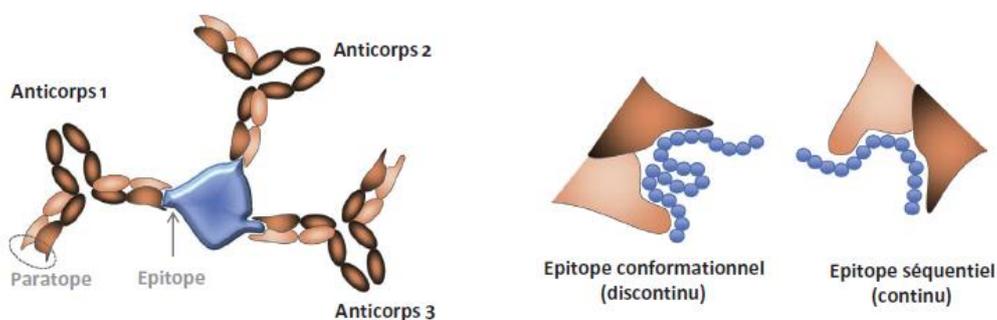
d'activation. Au décours des réponses immunitaires, les LB comme les LT donnent naissance à des cellules mémoires à longue durée de vie dont le rôle est de répondre plus rapidement et plus efficacement à une nouvelle exposition à un antigène donné (réponse secondaire ou anamnastique). C'est d'ailleurs sur ce principe qu'est basée la vaccination.

## 1. Les structures moléculaires reconnues par les récepteurs du système immunitaire adaptatif

### i. Notion d'antigène et d'épitope

Un antigène est une molécule pouvant être reconnue spécifiquement par le BCR des LB ou le TCR des LT. Alors que le BCR se lie à des antigènes natifs, le TCR se lie à des antigènes apprêtés et présentés sous forme de peptides associés aux molécules du CMH. La partie extracellulaire du BCR qui reconnaît l'antigène présente la même structure que les immunoglobulines (Ig) exerçant la fonction d'anticorps, sécrétées par les LB différenciés en plasmocytes.

Les différentes régions des antigènes reconnues par les anticorps, les BCR et les TCR sont appelés déterminants antigéniques ou épitopes alors que la région des anticorps, du BCR et du TCR reconnaissant les épitopes est appelée paratope. Un antigène contient généralement plusieurs épitopes différents. On distingue deux types d'épitopes : les épitopes linéaires ou séquentiels, qui correspondent à un enchaînement continu d'acides aminés adjacents, et les épitopes conformationnels ou discontinus, qui sont formés par un groupe d'acides aminés éloignés dans la séquence mais rapprochés les uns des autres, suite au repliement spatial d'une protéine (**Figure 3**). Les épitopes reconnus par les LB et donc les anticorps peuvent être linéaires ou conformationnels (Stave and Lindpaintner, 2013). En revanche, les épitopes reconnus par les LT, restreints à des peptides de 8 à 28 acides aminés présentés par les molécules du CMH, sont de fait des épitopes linéaires (voir le paragraphe suivant).



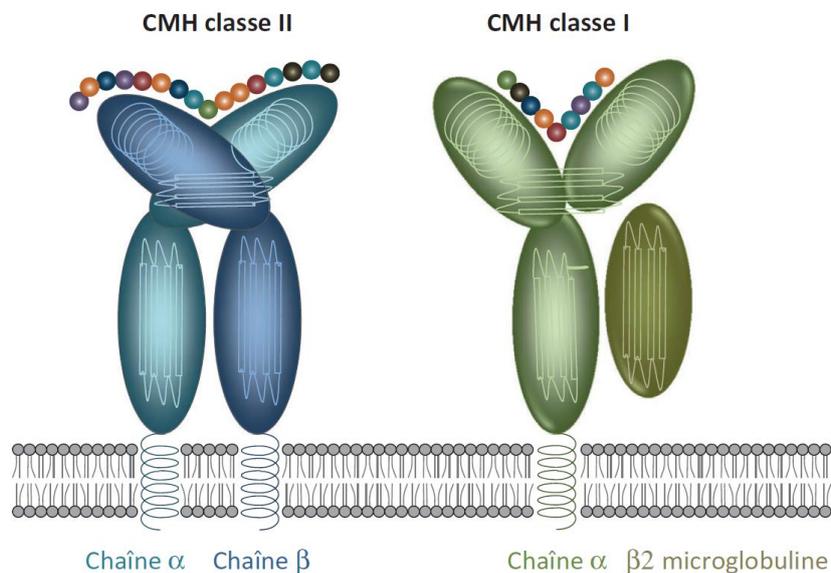
**Figure 3 : Les antigènes reconnus par l'immunité adaptative**

D'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.

**ii. Système HLA, apprêtement et présentation de l'antigène aux LT**

Les gènes HLA classiques, situés sur le bras court du chromosome 6, codent pour les molécules qui assurent la fonction de présentation de l'antigène et qui exercent un rôle majeur dans l'histocompatibilité, c'est à dire l'acceptation ou le rejet des greffes entre donneur et receveur. La région CMH de classe I (CMH I) comprend 3 gènes HLA de classe I classiques : HLA-A, HLA-B et HLA-C. La région CMH de classe II (CMH II) comprend 3 paires de gènes HLA de classe II classiques : HLA-DP (gènes DPA1 et DPB1), HLA-DQ (DQA1 et DQB1) et HLA-DR (DRA et DRB1). Les molécules du CMH I et II présentent des fragments protéiques (épitopes) aux LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, respectivement. Elles sont donc essentielles pour les réponses immunitaires cellulaires. Les gènes HLA sont les plus polymorphiques du génome humain (plusieurs milliers d'allèles pour la plupart d'entre eux), rendant chaque individu quasiment unique.

Les produits des gènes du CMH I et II ont la même structure générale. Il s'agit de domaines Ig (composés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  pour les molécules de classe II, et d'une chaîne  $\alpha$  associée à la  $\beta$ 2 microglobuline pour les molécules de classe I) surmontés de 2 hélices  $\alpha$  parallèles reposant sur une plage de feuillets  $\beta$ -plissés (**Figure 4**).

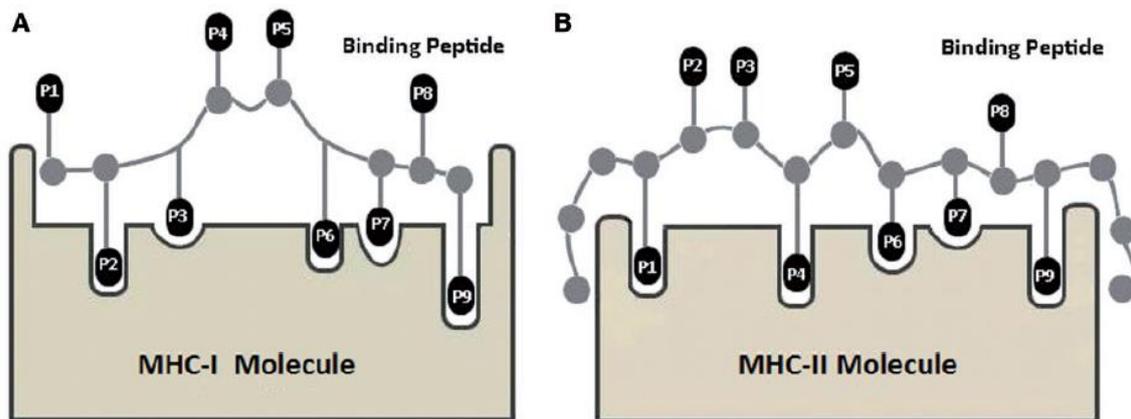


**Figure 4 : Structure des molécules du CMH de classe I et de classe II**

*D'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.*

Cette structure particulière génère un sillon dans lequel peut venir se fixer un peptide. Les résidus polymorphiques situés sur le dessus des hélices  $\alpha$  et interagissant avec le TCR sont la base de la spécificité des TCR pour un épitope fixé sur un variant allélique particulier d'une molécule du CMH :

c'est le phénomène de la restriction par le CMH. Les résidus polymorphiques situés au niveau du sillon vont influencer sur la nature et la localisation de ce que l'on appelle des poches d'ancrage situées dans le fond du sillon. Ces poches vont pouvoir contenir certains acides aminés de l'épitope, les résidus d'ancrage, ayant des caractéristiques physico-chimiques particulières (Zhang et al., 2012a). La séquence d'acides aminés constituant l'épitope va donc déterminer la nature des molécules du CMH auxquelles il va pouvoir se lier. Ainsi, en fonction de leur séquence, différents épitopes provenant d'un même antigène pourront généralement être présentés par différentes molécules du CMH. Le sillon du CMH I étant fermé, il va accueillir majoritairement des peptides de 8 à 12 acides aminés (9 en moyenne) (Engelhard, 1994). Le sillon du CMH II, qui lui est ouvert, va pouvoir accueillir des peptides ayant jusqu'à 28 acides aminés (en moyenne 14 à 18 résidus) (Rotzschke and Falk, 1994). La partie centrale du CMH II doit tout de même satisfaire les contraintes d'ancrage, comme pour le CMH I (Figure 5).

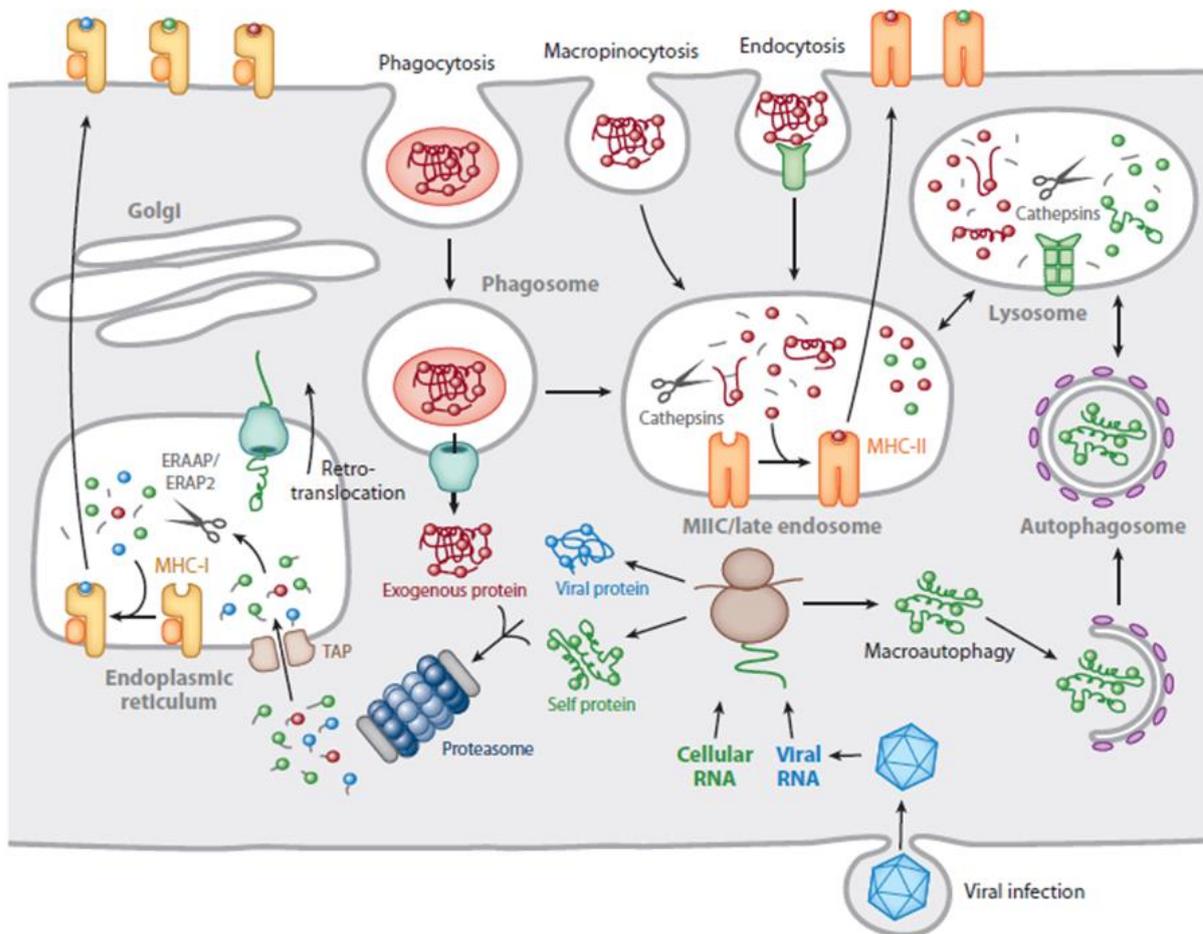


**Figure 5 : Illustration schématique de peptides se liant au sillon des molécules CMH de classe I (A) et de classe II (B)**

*D'après Zhang et al., 2011.*

Dans les conditions normales, les molécules du CMH I présentent des peptides provenant des protéines du soi synthétisées par la cellule, vis-à-vis desquels les LT CD8<sup>+</sup> sont tolérants. Cependant, lors d'une infection virale, des peptides provenant du virus vont faire partie du peptidome (ensemble des peptides exprimés à la surface des molécules du CMH), permettant ainsi au CTL de détecter la cellule infectée et de la lyser. Brièvement, les protéines cytosoliques sont dégradées par le protéasome en peptides de longueur variable. Ces peptides sont en grande majorité détruits par des peptidases cytosoliques. Cependant, une partie des peptides générés va rejoindre le réticulum endoplasmique par l'intermédiaire des transporteurs TAP (« transporter associated with antigen processing »). Ces peptides vont ensuite être chargés sur les molécules du CMH I à l'aide de

protéines chaperonnes. Les peptides trop longs vont alors pouvoir être raccourcis par des aminopeptidases (ERAAP/ERAP1 et ERAP2) présentes au sein du réticulum endoplasmique. Les peptides n'ayant pu être chargés sur les molécules du CMH I sont expulsés dans le cytosol afin d'être complètement dégradés. Les molécules du CMH I chargées avec les peptides sont ensuite exportées à la surface de la cellule afin de pouvoir être présentées aux LT CD8<sup>+</sup> (**Figure 6**) (Blum et al., 2013).



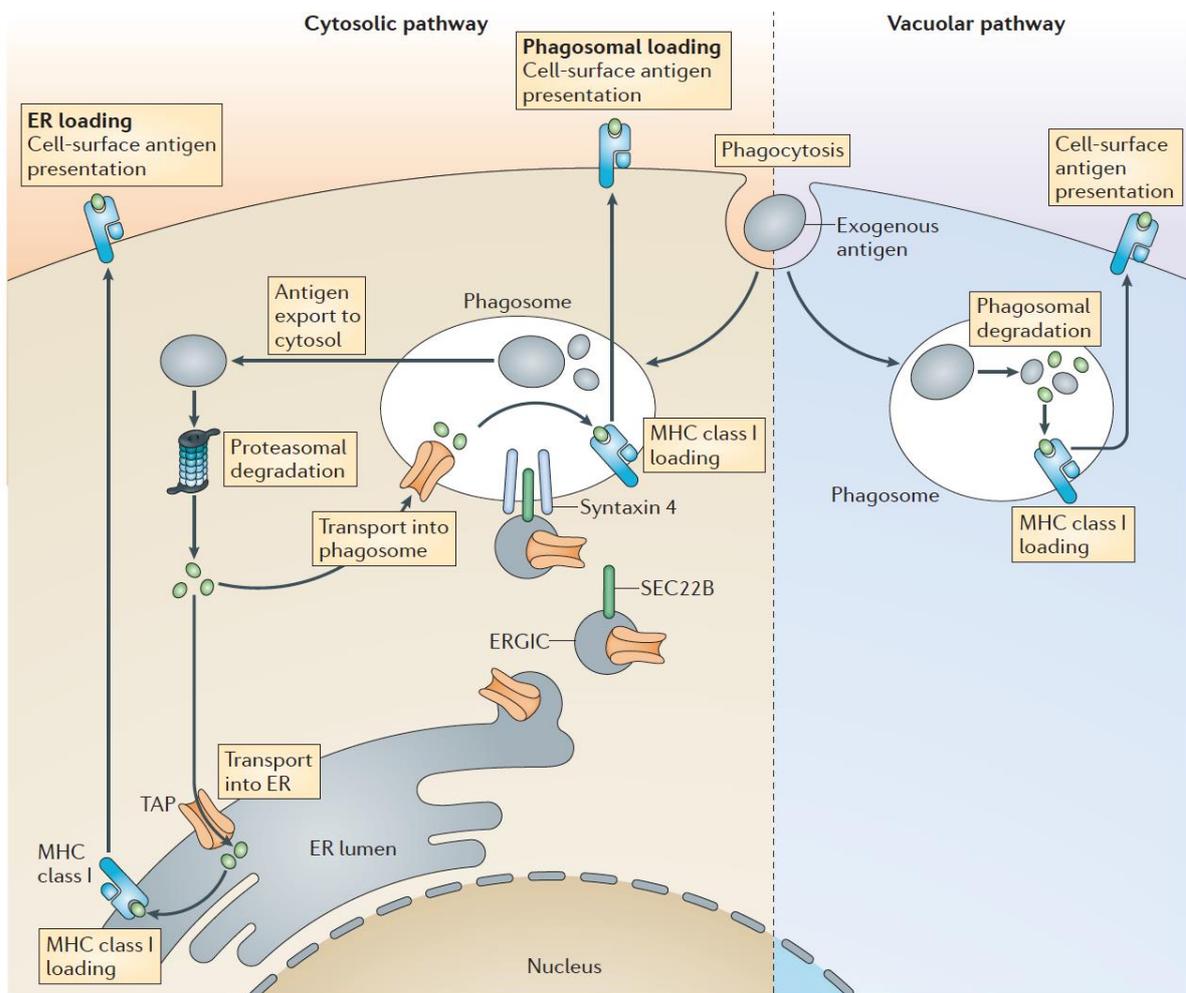
**Figure 6 : Apprêtement des antigènes et présentation classique et croisée par les molécules CMH de classe I et de classe II**

D'après Blum et al., 2013.

En parallèle, les molécules du CMH II présentent des peptides provenant essentiellement de protéines extracellulaires. Dans le cas d'une infection virale, le virion (ou particule virale) pourra donc être phagocyté et ses antigènes présentés aux LT CD4<sup>+</sup> par les molécules du CMH II. Brièvement, les protéines extracellulaires sont internalisées par différents mécanismes (endocytose, phagocytose, macropinocytose) puis sont dégradées en peptides par des protéases (cathepsines) au sein des endosomes tardifs (également appelés compartiments CMH-II ou MIIC). Ces peptides sont ensuite chargés sur les molécules du CMH II, puis les molécules du CMH II chargées avec les peptides sont

exportées à la surface de la cellule afin de pouvoir être présentées aux LT CD4<sup>+</sup>. Les protéines cytoplasmiques et/ou nucléaires endogènes peuvent également rejoindre les endosomes tardifs *via* le processus d'autophagie pour être présentées en association avec les molécules du CMH II (**Figure 6**) (Blum et al., 2013).

Certaines CPA, en particulier les DC peuvent présenter des antigènes provenant de cellules infectées qu'elles ont phagocytées en association avec les molécules du CMH I : il s'agit de la présentation croisée (**Figures 6 et 7**). Plusieurs mécanismes ont été décrits, impliquant une dégradation de l'antigène exogène par le protéasome ou le phagosome (**Figure 7**) (Joffre et al., 2012). Cette capacité très importante des DC est notamment exploitée dans le domaine de la vaccination afin de pouvoir générer des réponses T CD8<sup>+</sup> à partir d'antigènes vaccinaux protéiques ou peptidiques.



**Figure 7 : Voies intracellulaires de la présentation croisée dans les cellules dendritiques**

D'après Joffre et al., 2012. ER, réticulum endoplasmique ; ERGIC, compartiment intermédiaire du ER / Golgi.

Si les sources d'antigènes peuvent varier, les sources de clivage enzymatique de ces antigènes le peuvent aussi. En effet, si beaucoup de peptides présentés peuvent être générés par le protéasome conventionnel, le développement du système immunitaire a permis l'apparition de l'immunoprotéasome qui est exprimé constitutivement dans les DC et les lymphocytes, et qui est induit dans les autres types cellulaires par les interférons sécrétés lors d'infections virales. Cet immunoprotéasome possède des sous-unités catalytiques différentes du protéasome conventionnel, lui permettant de générer lors de la dégradation protéique des peptides différents ayant plus de chance de se fixer sur les molécules du CMH I. De plus, la nature et le nombre des peptidases cytosoliques ou associées au réticulum endoplasmique peuvent également varier suivant le type cellulaire (Rock et al., 2016).

Pratiquement toutes les cellules nucléées expriment des molécules CMH I. Leur densité varie selon le type cellulaire. On observe une forte densité ( $10^5$  par cellule) sur les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les DC ; une densité intermédiaire ( $10^4$ ) sur les cellules épithéliales et endothéliales ; une densité faible, voire nulle sur les hématies, les cellules du pancréas, des glandes salivaires, les hépatocytes, les neurones, la cornée, le placenta. La densité d'expression peut augmenter dans un contexte inflammatoire sous l'action de cytokines. L'expression des molécules CMH II est limitée à l'état de repos aux CPA (DC, monocytes/macrophages, LB et cellules épithéliales thymiques). L'activation de ces cellules augmente la densité d'expression des molécules du CMH II à leur surface. Chez l'homme, les neutrophiles, les LT, et les cellules épithéliales et endothéliales quiescentes n'expriment pas les molécules du CMH II, alors que l'activation de ces cellules (dans un contexte inflammatoire) induit cette expression.

Malgré le polymorphisme extrême des gènes HLA classique, plusieurs molécules HLA peuvent présenter les mêmes peptides. Ce phénomène est connu depuis longtemps pour les molécules du CMH II et lorsqu'un même peptide peut être présenté par un grand nombre de molécules de CMH II différentes on parle de peptide « promiscuous » (Panina-Bordignon et al., 1989). Plus récemment, ce phénomène a également été observé pour les molécules du CMH I (Frahm et al., 2007; Rao et al., 2011).

### ***iii. Le phénomène d'immunodominance***

La réponse cellulaire T vis-à-vis d'un antigène complexe est souvent dirigée contre un nombre très limité d'épitopes immunogènes, c'est le phénomène d'immunodominance (Katz et al., 1982). Ce phénomène complexe n'est pas encore totalement compris aujourd'hui mais il semble contrôlé par plusieurs facteurs :

- l'abondance de la protéine : dans le cas d'infections virales, la cinétique d'expression des protéines virales et l'intensité de la réplication virale (Luciani et al., 2013; Probst et al., 2003), ainsi que la quantité de protéines virales contenues dans le virion infectant la cellule cible (Briggs et al., 2004) sont des facteurs pouvant influencer l'immunodominance des réponses T CD8<sup>+</sup>,
- le processus d'apprêtement et de présentation des antigènes : la génération des épitopes T CD8<sup>+</sup> par le protéasome (Mo et al., 2000) ainsi que par des peptidases cytosoliques (Le Gall et al., 2007), mais également le transport des peptides générés vers le réticulum endoplasmique par les TAP (Neisig et al., 1995) est impacté par les résidus flanquant les épitopes,
- l'affinité des épitopes générés vis-à-vis des molécules du CMH I (Paul et al., 2013; Sette et al., 1994) ainsi que la stabilité du complexe CMH I/peptide (Harndahl et al., 2012),
- le nombre de LT CD8<sup>+</sup> précurseurs naïfs spécifiques d'un épitope donné (Kotturi et al., 2008), mais surtout la sélection de clones T CD8<sup>+</sup> exprimant un TCR avec des caractéristiques communes (« public TCR ») de haute affinité/avidité pour le complexe CMH/peptide (Trautmann et al., 2005).

De manière intéressante, il a été montré chez la souris que la nature des CPA (DC ou autres cellules non dendritiques) impliquées dans la réponse primaire et la réponse secondaire à l'infection par le virus influenza pouvait entraîner une variation de l'immunodominance des réponses T CD8<sup>+</sup> (Crowe et al., 2003). Etant donné l'importance de l'affinité de la liaison entre un peptide et une molécule du CMH I dans l'immunogénicité d'un épitope T CD8<sup>+</sup>, un lien direct a également été établi entre la présence de certains allèles du CMH I et la hiérarchie des réponses T CD8<sup>+</sup> dans l'infection aiguë par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) par exemple (Yu et al., 2002).

Concernant les épitopes T CD4<sup>+</sup>, il a été montré que la structure tridimensionnelle des protéines était responsable de l'immunodominance, et cela dans les infections par les virus influenza (Landry, 2008), VIH (Mirano-Bascos et al., 2008) ou encore la vaccination contre la fièvre jaune (Koblischke et al., 2017). Cependant, la stabilité du complexe CMH II/peptide est également un facteur clé impliqué dans la hiérarchie des réponses T CD4<sup>+</sup> (Lazarski et al., 2005). De plus, il a été montré plus récemment que les LT régulateurs (Treg) pouvaient également jouer un rôle dans l'immunodominance des réponses T CD4<sup>+</sup> (Tung and Sant, 2013).

On nomme généralement épitopes immunodominants les épitopes contre lesquels sont induits de fortes réponses immunitaires *in vivo*. Les épitopes sous-dominants sont ceux contre lesquels on ne détecte qu'une faible réponse *in vivo*. Enfin, les autres fragments peptidiques (la majorité) n'induisant aucune réponse immunitaire *in vivo* sont nommés épitopes cryptiques.

Il faut cependant noter que des épitopes sous-dominants et cryptiques sont capables de générer des réponses T spécifiques lorsqu'ils sont administrés directement en tant que peptides optimaux (et n'ont donc pas besoin d'être apprêtés pour être présentés par les CPA) lors de protocoles d'immunisation.

## 2. Les récepteurs du système immunitaire adaptatif

### *i. Le BCR et les Immunoglobulines*

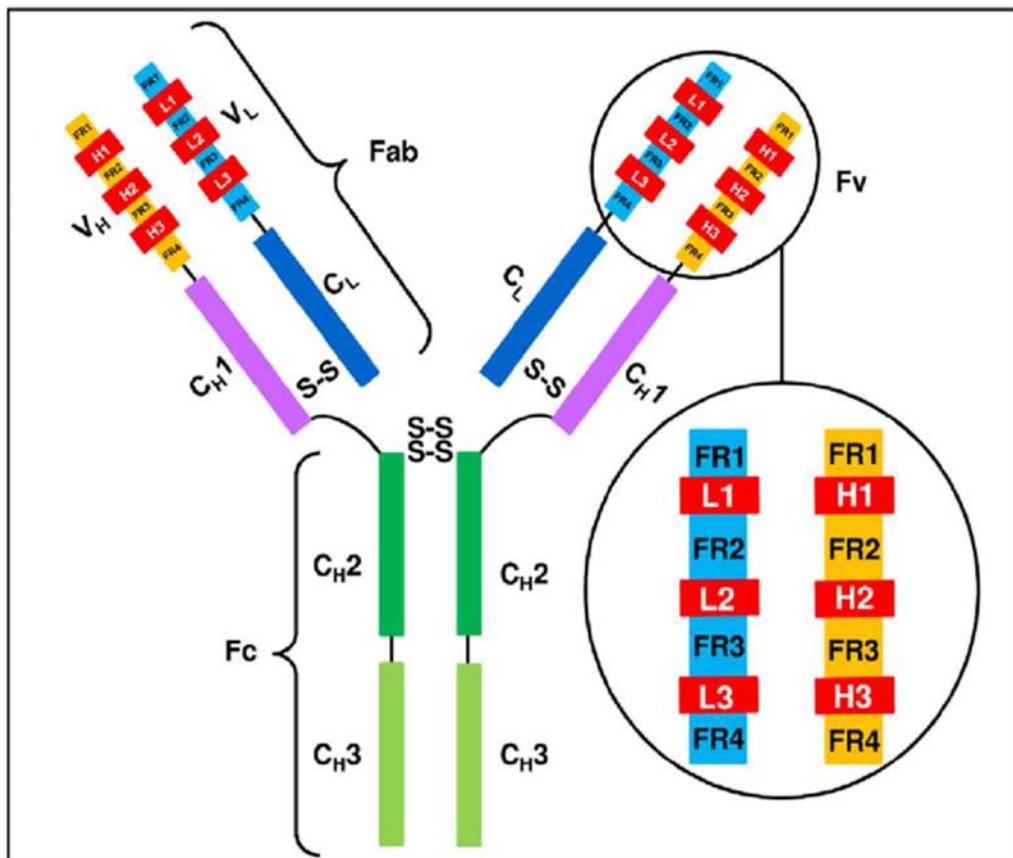
Les LB, qui représentent environ 5 à 15% des lymphocytes circulants, possèdent comme récepteur à l'antigène (BCR) une immunoglobuline (Ig) de surface produite par la cellule elle-même. Comme les LB ne sont pas l'objet principal de cette thèse, la structure du BCR ne sera pas présentée en détail ici.

Une fois activés, les LB se différencient en plasmocytes sécrétant des Ig (anticorps) de la même spécificité que leur BCR. On distingue cinq différentes classes principales d'anticorps (isotypes, classés ci-après par ordre décroissant de concentration sérique) ayant chacune leur fonction : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE (Lu et al., 2018). Les IgG et les IgA étant également divisées en différentes sous-classes. Les IgG sont des monomères qui constituent la classe majoritaire lors de la réponse secondaire. Les IgA sont majoritairement retrouvées dans les sécrétions muqueuses sous forme de dimères. Les IgM, qui présentent une structure pentamérique leur conférant un fort pouvoir agglutinant et leur permettant d'activer le complément, sont majoritaires dans la réponse primaire.

Les Ig sont des glycoprotéines constituées de quatre chaînes polypeptidiques homologues 2 à 2 : deux chaînes lourdes (H pour « heavy ») et deux chaînes légères (L pour « light »). Elles possèdent deux domaines fonctionnels différents. D'une part leurs deux extrémités variables nommées Fab (« antigen binding fragment ») qui leur confèrent leur spécificité antigénique, et d'autre part un domaine constant nommé Fc (« crystallizable fragment ») définissant leur fonction effectrice. Chaque Fab comprend une partie constante (C) et une partie variable (V) pour chaque chaîne polypeptidique et chaque partie variable comporte 3 domaines hypervariables CDR (« complementarity determining regions ») et 4 domaines charpentes FR (« framework regions ») (Sela-Culang et al., 2013) (Figure 8). Le repliement des chaînes peptidiques des régions VH et VL contenant chacune 3 CDR permet de rapprocher dans l'espace les 6 CDR qui forment ainsi le site de liaison à l'antigène.

Si la partie Fab permet à certains anticorps d'exercer une fonction neutralisante, la partie Fc permet aux anticorps de posséder également de multiples fonctions effectrices grâce aux divers récepteurs dirigés contre ce domaine (FcR) exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée. On peut ainsi distinguer l'ADCP (« antibody dependent cellular phagocytosis ») qui permet une augmentation de la

phagocytose par la fixation d'anticorps sur les cellules infectées ou sur l'antigène (opsonisation), l'ADCC (« antibody dependent complement deposition ») ou ADCDC (« antibody dependent complement dependent cytotoxicity ») qui permet une augmentation de l'activité du complément par la fixation d'anticorps sur les cellules infectées ou l'antigène, et l'ADCC (« antibody dependent cellular cytotoxicity ») qui permet une augmentation de l'activité cytotoxique des NK par la fixation d'anticorps sur les cellules infectées. Ces différentes fonctions peuvent être évaluées à l'aide d'une technologie appelée « system serology » (Chung et al., 2015).



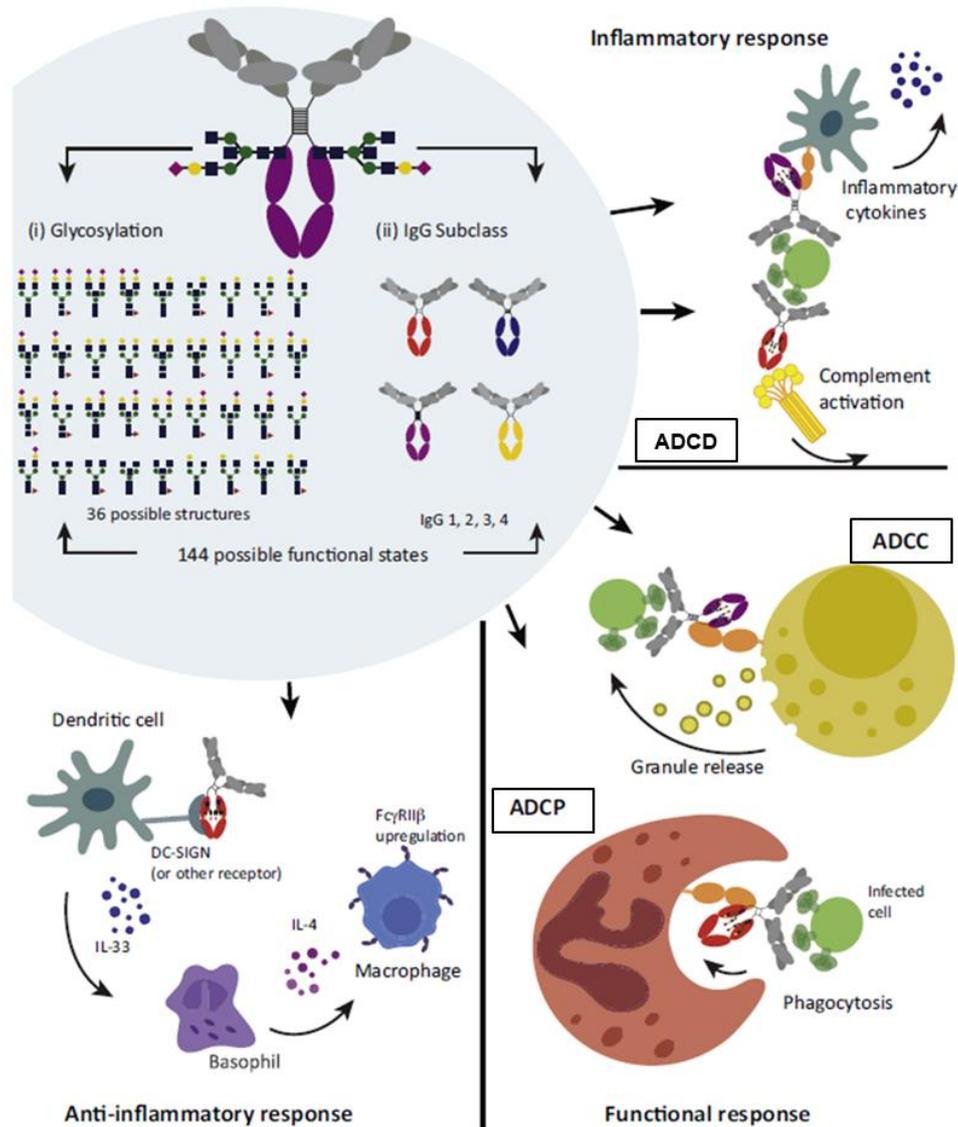
**Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'un anticorps**

*D'après Sela-Culang et al., 2013. Les régions CDR sont identifiées en rouge ; S-S, ponts disulfures.*

On sait également que la glycosylation des IgG permet le contrôle de ces différentes fonctions (Jennewein and Alter, 2017) (Figure 9). De manière intéressante, le domaine Fc peut aussi moduler l'affinité (force d'interaction entre un paratope et un épitope) et l'avidité (intensité de l'ensemble des forces d'interaction entre un antigène et l'ensemble des paratopes pouvant se fixer sur cet antigène) du Fab avec l'antigène par des interactions inter-moléculaires (Janda et al., 2016).

La réponse humorale peut donc agir sur les virus libres et neutraliser leur pouvoir infectieux en empêchant leur fixation aux cellules cibles ou en bloquant l'entrée dans la cellule cible *via* la fonction

neutralisante des anticorps, mais également permettre la lyse des cellules infectées *via* la fixation du complément (ADCD), l'aide à la phagocytose (ADCP), et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps par les NK (ADCC).



**Figure 9 : Diversité combinatoire et fonctions des anticorps médiées par le Fc**

Modifié d'après Jennewein & Alter, 2017.

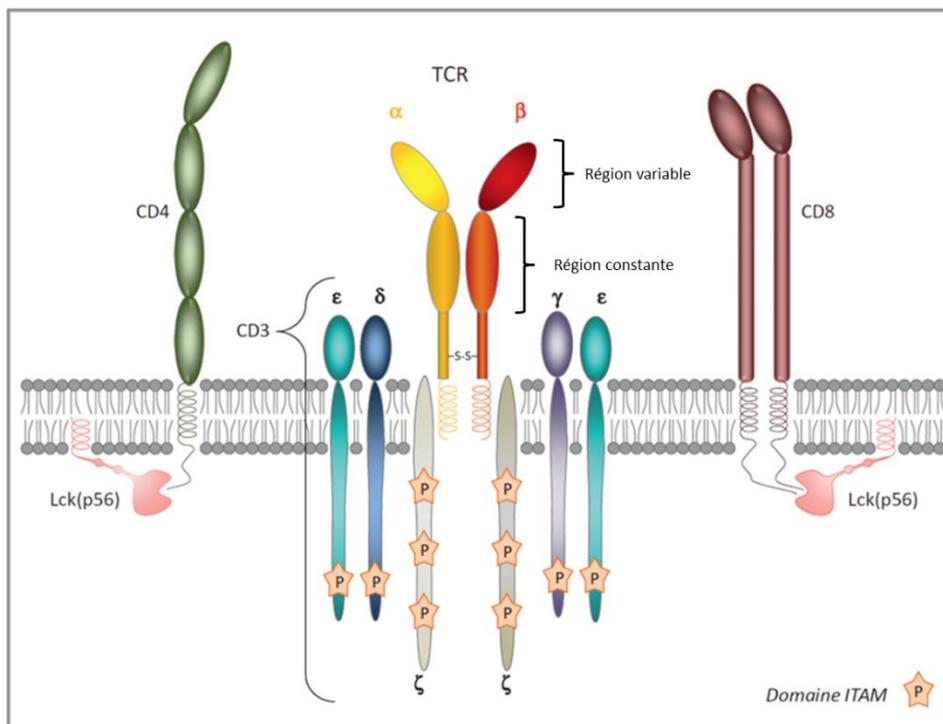
Il apparaît que les anticorps neutralisants jouent un rôle mineur dans le contrôle des infections de la famille des herpesviridae : EBV (« Epstein-Barr virus »), CMV (cytomégalovirus), VZV (« varicella zoster virus ») ; et des retroviridae : VIH, alors que leur production est essentielle pour prévenir et guérir les infections des familles picornaviridae : poliovirus ; ortho- et para-myxoviridae : virus de la grippe (Influenza), de la rougeole, des oreillons ; et flaviviridae : virus de la fièvre jaune, de la dengue, du Zika, de l'hépatite C.

## ii. Le TCR

On distingue deux catégories principales de LT : les LT auxiliaires ou « helper » (HTL) qui agissent comme chefs d'orchestre de la réponse immunitaire adaptative et qui expriment le marqueur CD4 (LT CD4<sup>+</sup>), et les LT cytotoxiques (CTL) qui sont responsables de la destruction des cellules infectées et qui expriment le marqueur CD8 (LT CD8<sup>+</sup>). Il existe également des LT régulateurs (Treg) exerçant des fonctions de régulation et d'inhibition des réponses immunitaires. Ces différents lymphocytes possèdent un TCR qui leur permet de reconnaître des peptides antigéniques présentés par le CMH. Le TCR forme un complexe multimoléculaire comportant :

- un module de reconnaissance, ou TCR proprement dit, constitué d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  de la famille des Ig, comportant chacune un domaine variable et un domaine constant, une partie transmembranaire et quelques acides aminés intracytoplasmiques ;

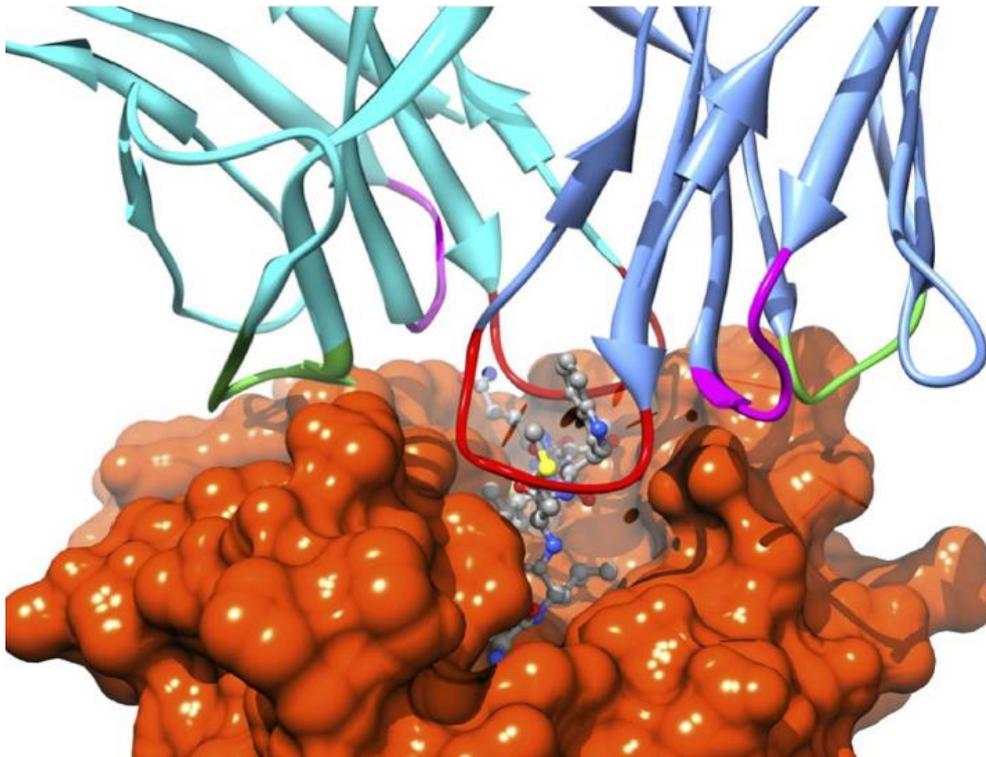
- un module de transduction du signal, ou complexe CD3, qui comprend 4 molécules de la superfamille des Ig arrangées de part et d'autre du TCR. Ce complexe CD3 comprend sur ces portions intracytoplasmiques 10 motifs d'activation ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif »), sièges de résidus tyrosine cibles de phosphorylation par des protéines kinases spécifiques à l'origine de la transduction du signal d'activation (**Figure 10**). Après une signalisation intracellulaire complexe, l'activation du TCR aboutit à la transcription de gènes gouvernant la prolifération, la survie, et la différenciation du LT (IL-2, récepteurs de cytokines etc...).



**Figure 10 : Description du TCR**

Modifié d'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.

Chaque TCR est différent d'un LT à l'autre du fait de modifications dans les régions variables des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui le composent. L'organisation spatiale du TCR montre que chaque partie variable comporte 3 domaines CDR (« complementarity determining regions »). Les domaines CDR1 et CDR2 reconnaissent les hélices  $\alpha$  du CMH alors que le domaine CDR3 est en contact avec le peptide présent dans le sillon du CMH (Zoete et al., 2013) (**Figure 11**). Le TCR  $\alpha\beta$  entre ainsi en contact avec un complexe CMH/peptide pour lequel environ un tiers des acides aminés (2 à 4) sont ceux du peptide antigénique et deux tiers sont des acides aminés des deux hélices  $\alpha$  du CMH. Les molécules CD4 et CD8 stabilisent l'interaction CMH/TCR en interagissant avec une partie faiblement polymorphe du CMH et participent à la signalisation intracellulaire en recrutant des kinases de type Src (les protéines p56lck).



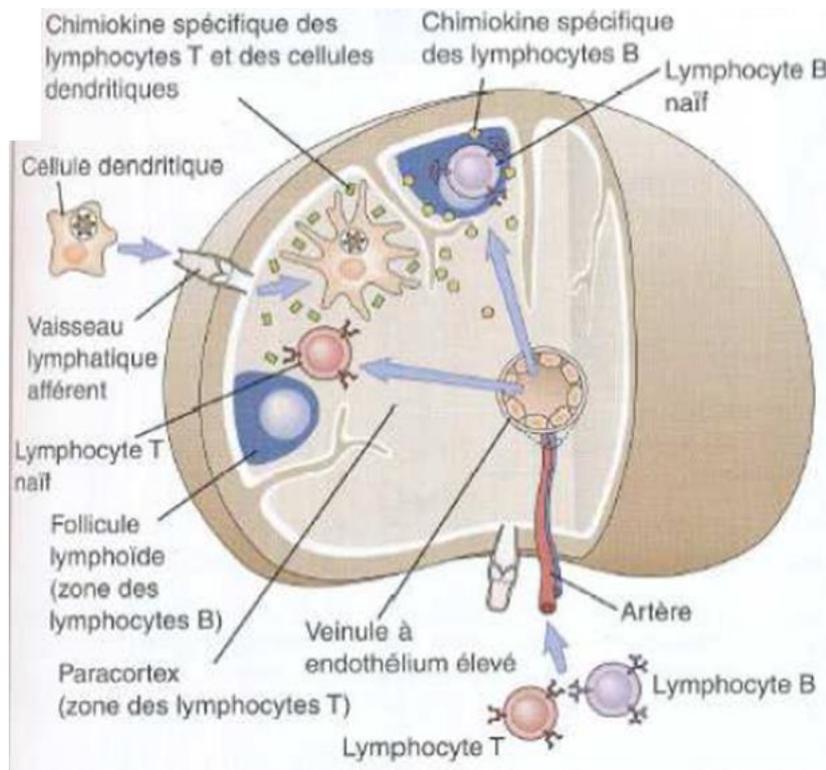
**Figure 11 : Positionnement des CDR du TCR à la surface du complexe CMH/peptide**

*D'après Zoete et al., 2013. Les CDR1, CDR2, et CDR3 sont colorés respectivement en mauve, vert, et rouge.*

En plus du TCR  $\alpha\beta$  exprimé sur les LT, il existe également un TCR  $\gamma\delta$  exprimé sur certains LT particuliers faisant partie des cellules de l'immunité innée et retrouvés essentiellement dans les tissus, les muqueuses et la peau.

### 3. Le ganglion : centre de la réponse immunitaire adaptative

Les organes lymphoïdes secondaires et particulièrement les ganglions lymphatiques constituent le lieu d'activation privilégié des lymphocytes B et T. En effet, ces structures possèdent une microarchitecture très organisée dont le contrôle est médié par les chimiokines CXCL13 (BCA-1 « B cell-attracting chemokine 1 » ou encore BLC « B lymphocyte chemoattractant »), CCL19 (MIP-3 $\beta$  « macrophage inflammatory protein 3 beta ») et CCL21 (6Ckine) sécrétées par les cellules stromales qui les composent. Ainsi, les LB qui expriment la molécule CXCR5 (récepteur de CXCL13) vont être attirés dans la zone B (ou corticale) du ganglion tandis que les LT exprimant CCR7 (récepteur de CCL19 et CCL21) seront eux attirés dans la zone T (ou paracorticale) du ganglion (**Figure 12**). Après être arrivées dans les ganglions par le vaisseau lymphatique afférent, les DC qui sont devenues matures vont délivrer aux LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> provenant de la circulation les signaux d'activation, de prolifération et de différenciation qui sont nécessaires à l'induction de la réponse immunitaire cellulaire en formant la synapse immunologique. Les ganglions lymphatiques sont également le lieu privilégié des interactions LB / FDC (cellule folliculaire dendritique) et LB / TFH (lymphocyte T folliculaire « helper ») permettant l'induction d'une réponse humorale efficace.



**Figure 12 : Organisation d'un ganglion lymphatique**

#### 4. Activation et différenciation des LB

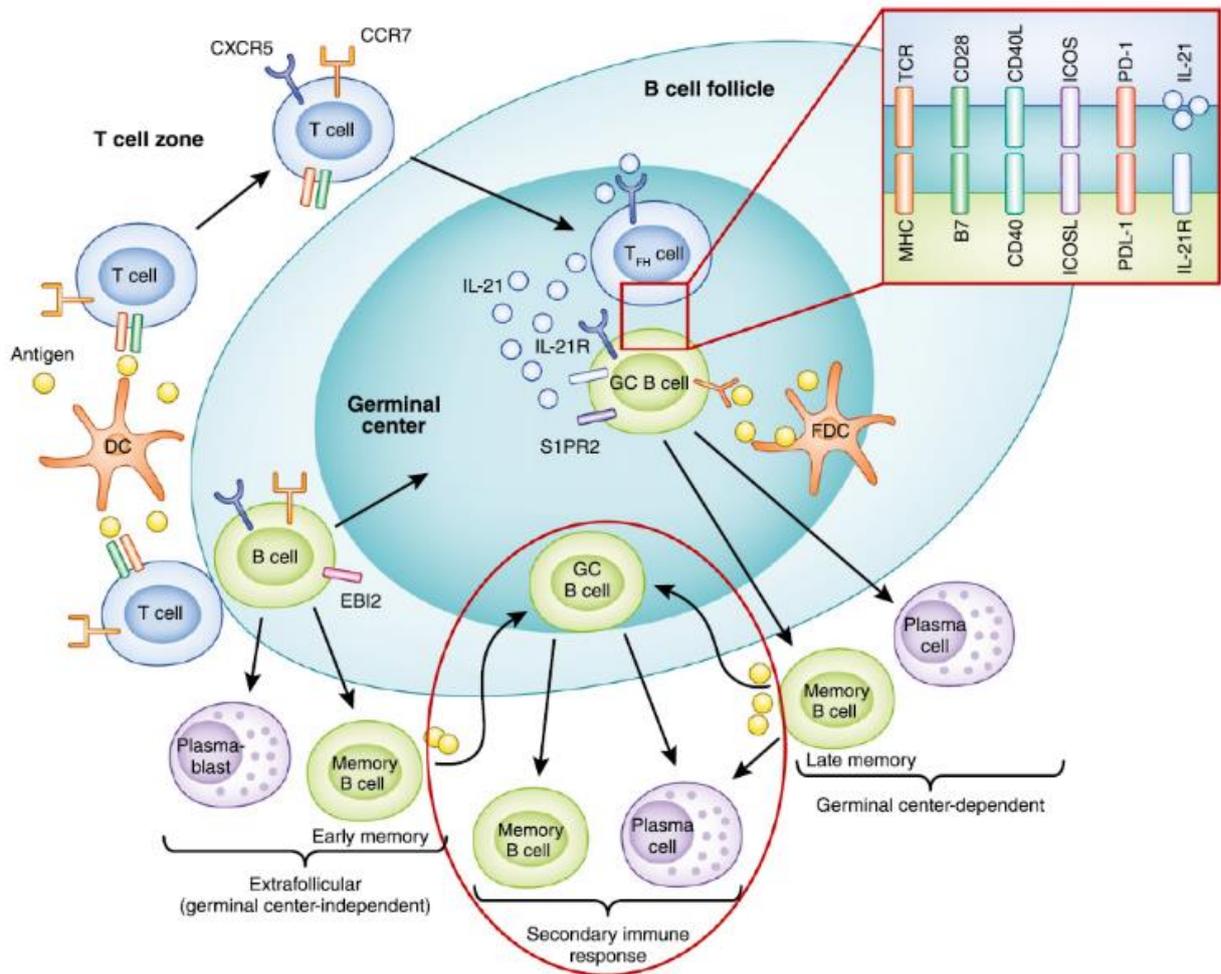
Les LB représentent 80% des cellules des organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, plaques de Peyer). Après être rentrés dans la zone corticale du ganglion lymphatique, les LB naïfs du sang périphérique vont capter leur antigène spécifique sous forme soluble, d'immuns complexes libre, ou encore à la membrane de FDC ou de macrophages du sinus sous-capsulaire. La liaison de l'antigène avec le BCR entraîne alors l'activation du LB et l'internalisation du complexe BCR/antigène qui va permettre l'apprêtement de l'antigène et son association avec les molécules HLA de classe II exprimées par le LB.

Après migration du LB à l'interface des zones B et T du ganglion par l'augmentation de l'expression à sa surface des molécules CCR7 et EB12 (« Epstein-Barr virus-induced receptor 2 »), le LB va pouvoir présenter l'antigène au LT auxiliaire en train de se différencier en TFH, exprimant Bcl6 (B-cell lymphoma 6) et produisant de l'IL-21, suite à son activation préalable dans la zone T par une DC lui ayant présenté le même antigène. Après cette activation mutuelle, les LB naïfs vont pouvoir se différencier rapidement en plasmocytes à IgM (Ig pentamériques fixant le complément mais de faible affinité pour l'antigène) de courte durée de vie ou en LB mémoires extrafolliculaires (indépendants du centre germinatif). Les TFH vont eux pouvoir gagner la zone B suite à la perte de l'expression de CCR7 au profit de CXCR5. Les LB qui vont exprimer Bcl6 vont pouvoir rejoindre les follicules de la zone B et former des centres germinatifs où ils sont retenus par l'expression de la molécule S1PR2 (« sphingosine-1-phosphate receptor 2 ») et où ils subissent les processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classe isotypique générant des LB mémoires et des plasmocytes à IgG de haute affinité pour l'antigène et à longue durée de vie, dépendants des centres germinatifs. Ces processus sont possibles grâce à l'interaction des LB avec les FDC et les TFH (**Figure 13**).

Suite à une réexposition antigénique, les LB mémoires extrafolliculaires vont cette fois rentrer dans les centres germinatifs afin de générer des LB mémoires et des plasmocytes de haute affinité, tandis que les LB mémoires dépendants des centres germinatifs peuvent rapidement se différencier en plasmocytes secondaires ou ré-entrer dans les centres germinatifs afin de produire des LB et plasmocytes secondaires (Hoffman et al., 2016; Sebina and Pepper, 2018).

Les cellules B mémoires constituent donc la population cellulaire qui répondra rapidement lors de la réintroduction de l'antigène par une différenciation massive en plasmocytes induisant une réponse anticorps secondaire, caractérisée par une plus forte amplitude et une production majoritairement d'IgG de meilleure affinité pour l'antigène. Au-delà de leur rôle de précurseurs des plasmocytes, les LB ont également un rôle de CPA aux LT. Cette propriété est à la base de la coopération cellulaire

entre les lymphocytes T et B afin de réguler l'activation de ces-derniers et ainsi la production des anticorps.

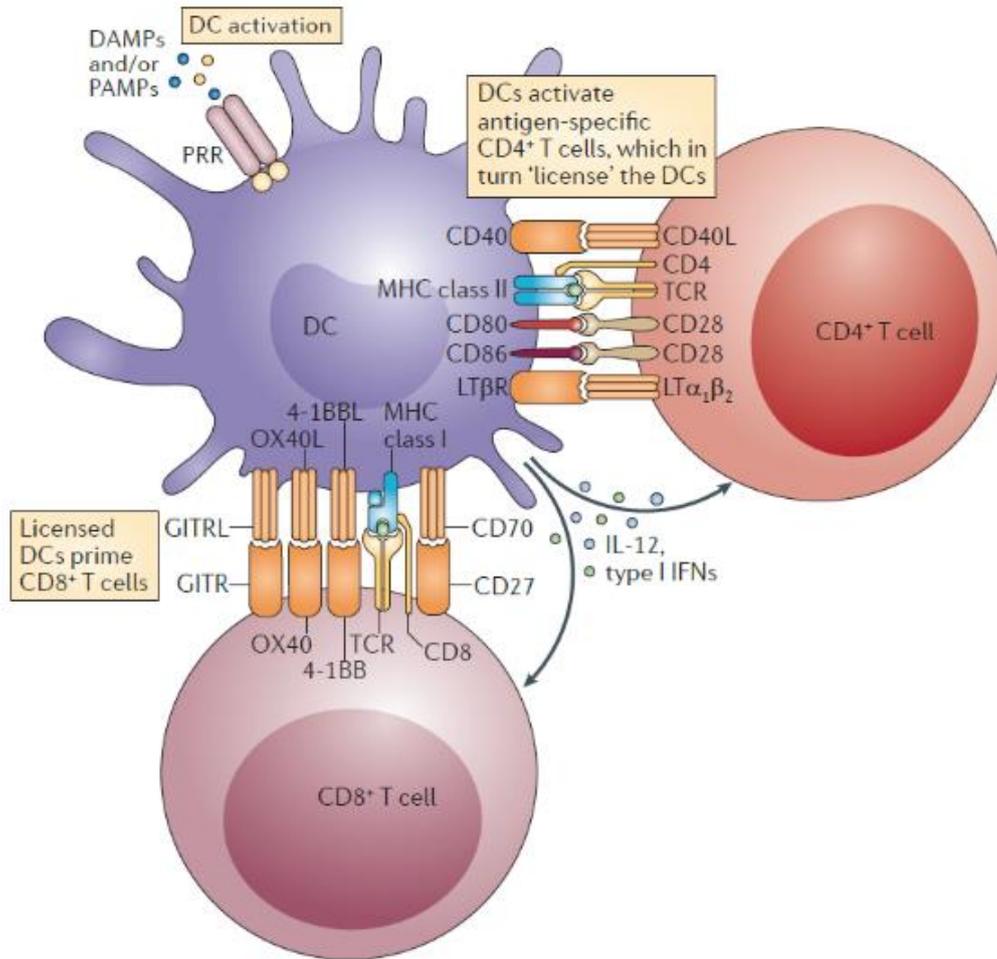


**Figure 13 : Activation et différenciation des LB naïfs en LB mémoires et plasmocytes**

D'après Hoffman et al., 2016. CCR7, C-C chemokine receptor 7; EB12, Epstein-Barr virus-induced receptor 2; Tfh, T follicular helper cells; GCs, germinal centers; S1PR2, sphingosine-1-phosphate receptor 2; ICOSL, inducible costimulator ligand; PDL1, programmed cell death protein ligand 1; IL21R, IL-21 receptor.

## 5. Activation et différenciation des LT

Une fois arrivées dans les organes lymphoïdes secondaires, les DC matures vont présenter les antigènes chargés sur les molécules du CMH aux LT. Lors de la synapse immunologique, le dialogue LT-DC fait intervenir la reconnaissance du peptide par le TCR associé au complexe CD3, les molécules du CMH, des molécules de costimulation et des molécules d'adhésion (Summers deLuca and Gommerman, 2012) (Figure 14). Les DC interviennent dans ce dialogue comme activateurs, mais également comme régulateurs de la réponse immunitaire en orientant la polarisation des LT vers la voie fonctionnelle la plus adaptée à l'agression.



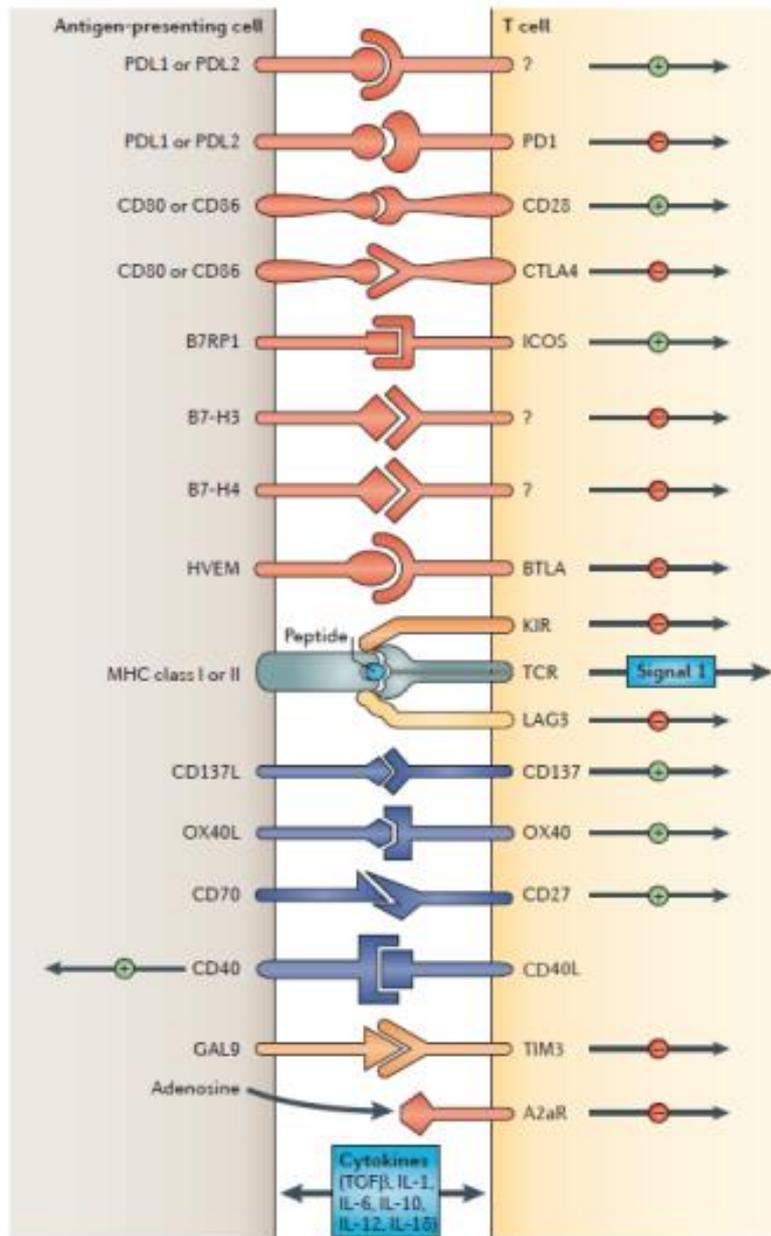
**Figure 14 : La synapse immunologique**

*D'après Summers deLucas & Gommerman, 2012. 4-1BBL, 4-1BB ligand ; GITR, glucocorticoid-induced TNFR-related protein ; GITRL, GITR ligand ; LT $\alpha_1\beta_2$ , lymphotoxin- $\alpha_1\beta_2$ ; LT $\beta$ R, LT $\beta$  receptor ; OX40L, OX40 ligand.*

La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR est le premier signal d'activation des LT naïfs.

Le second signal est apporté par les molécules de costimulation CD80 et CD86 exprimées à la surface de la DC et qui vont se fixer sur les molécules CD28 exprimées par le LT. Ce second signal est capital pour induire la prolifération du LT. En l'absence de ce-dernier, le LT devient anergique (inactif). L'induction de l'expression de CD40-Ligand (CD154) à la surface du LT va renforcer le signal induit par CD28 en se fixant sur le CD40 exprimé à la surface de la DC. Pendant cette phase de la synapse immunologique qui va durer 2 à 3 jours, d'autres molécules de costimulation vont pouvoir moduler l'activation du LT. L'ensemble de ces molécules activatrices ou inhibitrices du LT sont nommés les « immune checkpoints » (Pardoll, 2012) (Figure 15). On peut notamment citer comme molécules activatrices CD27, OX40 (ou CD134), CD137 (ou 4-1BB) ou encore ICOS (« inducible T-cell

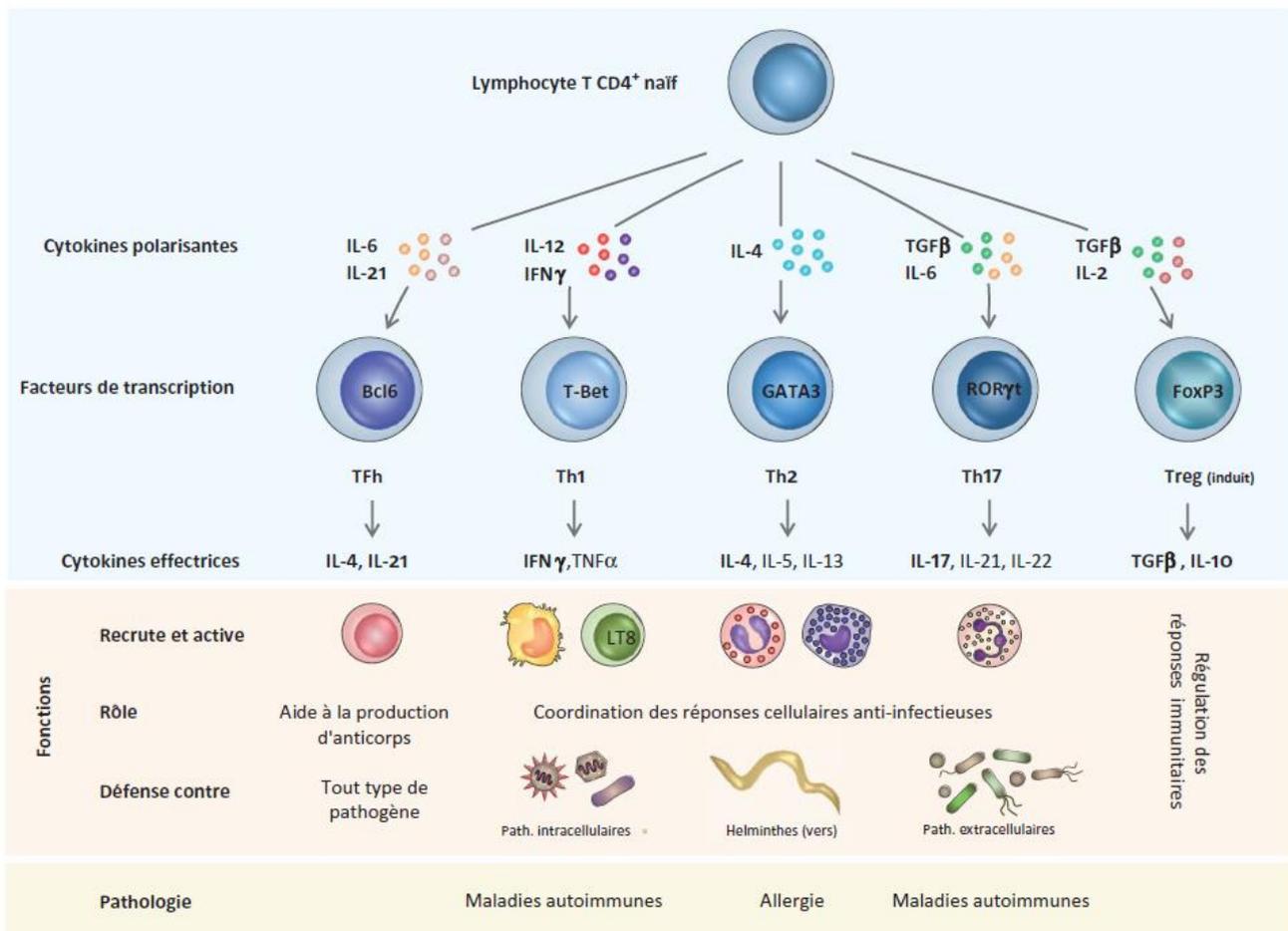
costimulator »), et comme molécules inhibitrices TIM3 (« T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3 »), BTLA (« B- and T-lymphocyte attenuator »), LAG3 (« lymphocyte activation gene 3 ») et PD1 (« programmed cell death 1 »). L'expression de la molécule CTLA-4 (« cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein 4 »), qui se lie également aux molécules CD80 et CD86, par le LT activé arrête la signalisation activatrice, permettant ainsi au LT de reprendre ses mouvements et de poursuivre sa prolifération (expansion clonale) et sa différenciation.



**Figure 15 : Les différentes molécules activatrices ou inhibitrices du LT**

D'après Pardoll, 2012. A2aR, adenosine A2a receptor; B7RP1, B7-related protein 1; BTLA, B and T lymphocyte attenuator; GAL9, galectin 9; HVEM, herpesvirus entry mediator; ICOS, inducible T cell co-stimulator; IL, interleukin; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; LAG3, lymphocyte activation gene 3; PD1, programmed cell death protein 1; PDL, PD1 ligand; TGFβ, transforming growth factor-β; TIM3, T cell membrane protein 3.

Le troisième signal reçu par le LT est donné par des cytokines présentes dans le microenvironnement du ganglion lymphatique. Ces cytokines sont produites majoritairement par les DC mais également par les autres cellules immunitaires du voisinage. Ces cytokines vont participer à la différenciation fonctionnelle des LT CD4<sup>+</sup> en lymphocytes T « helper » (HTL) ou en lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) et des LT CD8<sup>+</sup> en CTL. Les HTL présentent une hétérogénéité fonctionnelle et sont classés en différentes catégories suivant le répertoire de cytokines qu'ils sécrètent (**Figure 16**). Lors d'une infection virale, les mDC vont produire de l'IL-12 et de l'IFN $\gamma$  qui vont polariser les LT CD4<sup>+</sup> naïfs vers un profil Th (T « helper ») 1 sécrétant essentiellement de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  et de l'IL-2. De manière intéressante, il existe une certaine plasticité entre les différents profils de HTL (DuPage and Bluestone, 2016).



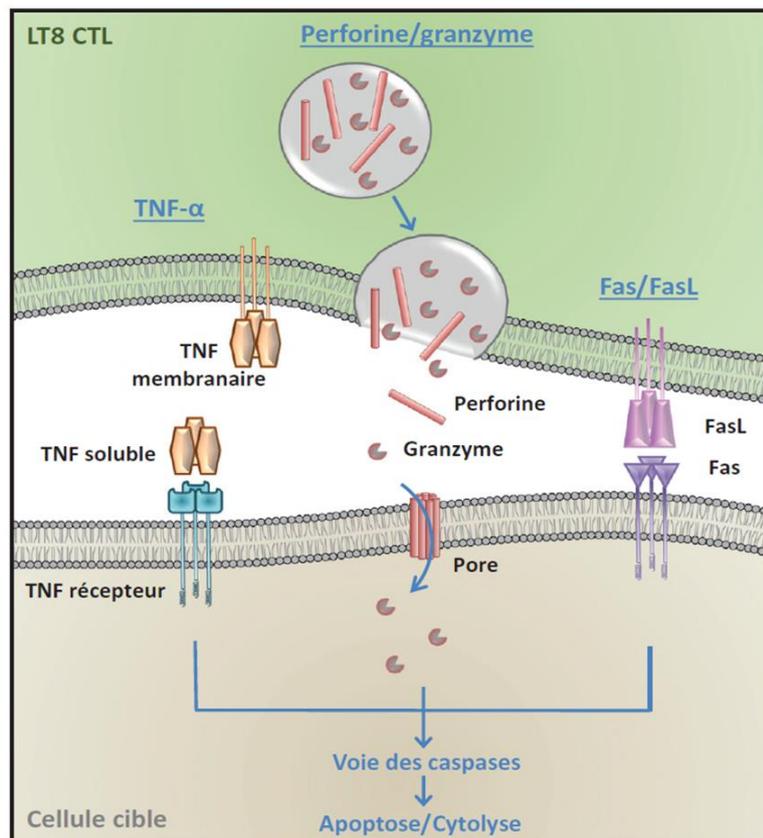
**Figure 16 : Polarisation et fonctions des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

D'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.

Pour se différencier de façon optimale en CTL, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs ont également besoin de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$  sécrétés par les Th1. Cependant, lors d'une infection virale, l'aide cytokinique

apportée par les LT CD4<sup>+</sup> peut être remplacée par des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL12 et l'IFN- $\alpha/\beta$ , sécrétées par les cellules de l'immunité innée (DC, macrophages, granulocytes).

Les CTL exercent leur action cytotoxique par plusieurs mécanismes (**Figure 17**). Le plus documenté est l'exocytose de molécules toxiques pour la cellule cible. Ces molécules (perforine et granzymes) sont contenues dans des granules cytoplasmiques du CTL. Une fois libérée, la perforine va former de manière transitoire un pore dans la membrane de la cible qui va permettre l'entrée dans le cytoplasme des granzymes A et B qui vont alors déclencher l'apoptose de la cellule cible de façon indépendante ou dépendante des caspases, respectivement (Voskoboinik et al., 2015). Il a été montré que les CTL pouvaient tuer de cette manière plusieurs cellules cibles à la fois (Wiedemann et al., 2006). Le deuxième mécanisme de cytotoxicité implique des récepteurs à domaines de mort tels que Fas (« apoptosis-stimulating fragment ») et le récepteur au TNF (TNF-R). En effet, le CTL activé va exprimer la molécule Fas ligand (FasL, encore appelé CD95L) qui va se lier à son récepteur Fas (CD95) se trouvant à la surface de la cellule cible et déclencher son apoptose. Le TNF $\alpha$  sécrété par les CTL va aussi se fixer sur le TNF-R exprimé par la cellule cible, entraînant également sa mort par un même mécanisme d'apoptose *via* la voie des caspases.



**Figure 17 : Mécanismes employés par le CTL pour tuer les cellules infectées**

Modifié d'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.

Les granzymes B (majoritairement sécrétées par les CTL) induisent l'apoptose des cellules cibles en quelques minutes (Lopez et al., 2013), alors que l'interaction Fas/FasL peut prendre plusieurs heures pour induire l'apoptose de la cellule cible. Il a été montré chez des souris infectées par le « Friend Murine Leukemia Virus » que l'utilisation de la voie perforine/granzyme ou Fas/FasL par les CTL dépendait du niveau de réplication du rétrovirus (Zelinskyy et al., 2007).

Les CTL participent également à la lutte contre les virus en produisant des chimiokines et cytokines, notamment l'IFN $\gamma$  qui possède des effets antiviraux directs, en diminuant la perméabilité des cellules cibles au virus ; et indirects, en permettant l'activation des macrophages et des cellules NK qui peuvent également détruire les cellules infectées, ou encore l'augmentation de la transcription et de l'expression membranaire des molécules du CMH.

De manière intéressante, des LT CD4<sup>+</sup> cytotoxiques ont été décrits dans différentes infections virales. Ces cellules sont notamment capables de détruire les cellules infectées par les virus suivants : Influenza A (grippe), EBV, CMV, HPV (« human papilloma virus »), VHB (virus de l'hépatite B), VHC (virus de l'hépatite C), et VIH (Juno et al., 2017; Muraro et al., 2017).

L'activation des lymphocytes naïfs spécifiques de l'antigène va induire leur expansion clonale. Cette phase va permettre en 4 à 5 jours de multiplier ces cellules de 1 000 à 10 000 fois. Le répertoire des LT CD8<sup>+</sup> naïfs étant très étendu, la fréquence d'un LT CD8<sup>+</sup> spécifique d'un complexe CMH/peptide antigénique parmi l'ensemble des LT CD8<sup>+</sup> naïfs est très faible (1/10 000 à 1/100 000). L'expansion clonale est donc une étape primordiale afin que les LT CD8<sup>+</sup> se différencient rapidement en CTL capables d'éliminer les cellules infectées par le virus. Parallèlement à la phase d'expansion clonale, la génération de lymphocytes mémoires va avoir lieu.

Suite à l'élimination du pathogène, les cellules spécifiques de l'antigène activées vont mourir : il s'agit de la contraction clonale. Pendant cette phase, plus de 90% des LT activés vont être éliminés par apoptose. Cette apoptose peut être induite :

- soit par l'activation cellulaire ou AICD (« Activation Induced Cell Death »), due au réengagement du TCR et des « immune checkpoint » sur les CPA, favorisé par la proximité cellulaire au site même de l'expansion clonale. L'AICD permet d'éviter la prolifération incontrôlée du clone ainsi que sa sur-activation, qui pourrait être la cause de maladies auto-immunes,

- soit par apoptose passive liée à la carence en cytokines, notamment l'IL-2, dans les sites initiaux de l'infection. Cette apoptose passive peut être due à la disparition de l'antigène et /ou la présence de Treg.

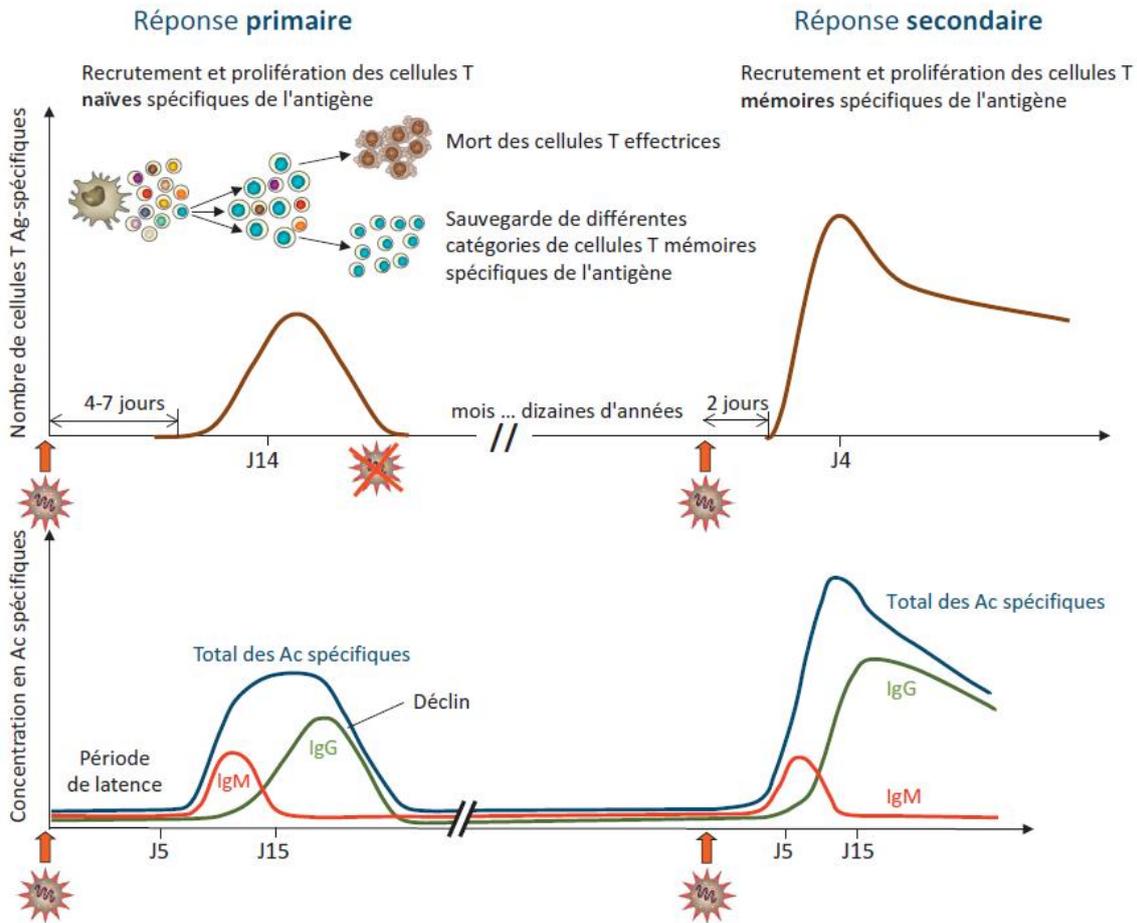
Cependant, cette régulation négative peut limiter l'efficacité des réponses immunitaires adaptatives en cas d'exposition antigénique chronique où l'augmentation des signaux inhibiteurs contribue à

l'épuisement des lymphocytes. En effet, dans la plupart des cas, les réponses adaptatives permettent une élimination rapide des virus. Cependant, du fait de multiples mécanismes d'échappement des virus à la réponse immunitaire, en particulier aux CTL (mutations antigéniques, diminution de l'expression des molécules du CMH I...), les LT CD8<sup>+</sup> ne parviennent pas toujours à éliminer complètement les virus mais permettent seulement un contrôle de sa réplication. C'est le cas pour les infections par l'EBV et le CMV. Mais pour certaines infections virales, la réplication du virus ne peut purement et simplement pas être contrôlée. Il se développe alors une infection dite chronique avec réplication et détection permanente du virus, comme par exemple lors de l'infection par les virus des hépatites B et C ou encore par le VIH. Dans ces situations de réactivations et d'amplifications clonales successives, les LT CD8<sup>+</sup> mémoires peuvent atteindre un stade de vieillissement cellulaire ou sénescence. Ce stade cellulaire se caractérise par l'absence d'expression de la molécule de costimulation CD28 ainsi que l'expression du marqueur de sénescence CD57, reflétant une perte définitive de leur capacité à proliférer. Ainsi, une stimulation permanente des CTL va conduire à la disparition par apoptose des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du virus ainsi qu'à l'épuisement clonal. D'ailleurs, le meilleur marqueur du vieillissement immunologique semble être le déclin de la fréquence des cellules T naïves qui est comparable chez des individus de 40 ans infectés par le VIH-1 à celle de sujets de 85 ans non-infectés ([Appay and Kelleher, 2016](#)).

## 6. Mise en place de la mémoire immunologique

Comme nous l'avons expliqué précédemment, le premier contact avec un virus va également générer des cellules mémoires qui vont persister dans l'organisme au long cours. Le phénotype mémoire est associé à des modifications épigénétiques, transmises au cours de leur prolifération, modulant les protéines qu'elles expriment et leur rapidité à les produire. Les lymphocytes B et T mémoires permettront donc, lors d'une nouvelle infection par le même agent viral, la génération d'une réponse secondaire plus rapide et plus efficace (**Figure 18**).

Le nombre de cellules mémoires est supérieur à celui des LT naïfs originels et la plupart du temps proportionnel à l'expansion initiale donc à la quantité d'antigène à laquelle l'organisme a été exposé initialement.



**Figure 18 : Réponses immunitaires antivirales primaire et secondaire**

D'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson.

Les LB mémoires, qui sont identifiables par la présence de la molécule CD27 à leur membrane, sont des cellules circulantes qui se localisent également dans les organes lymphoïdes. Environ 50 % de ces cellules ont effectué une commutation isotypique.

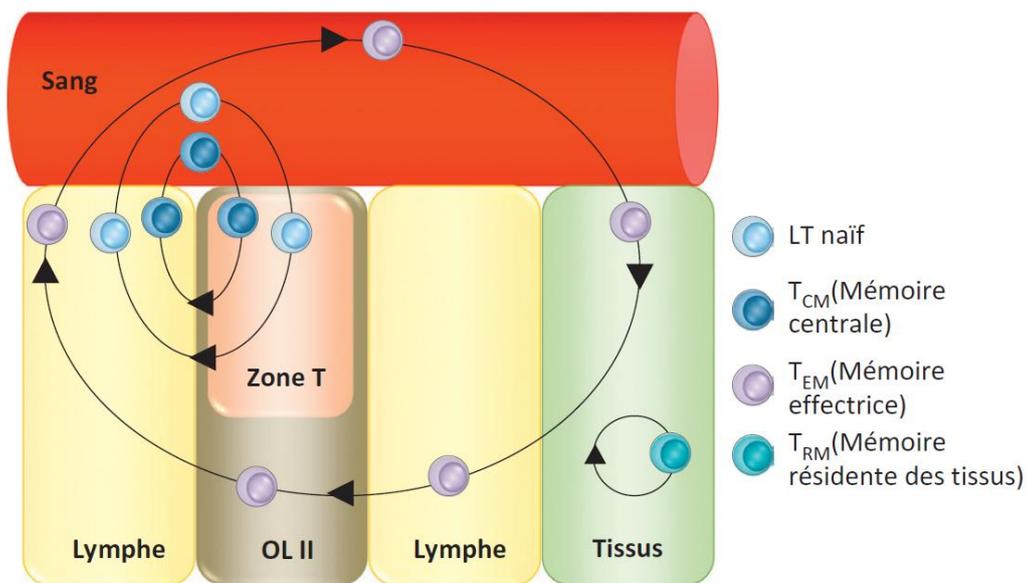
Les LT mémoires constituent un compartiment hétérogène dont la composition est déterminée par les conditions initiales d'activation (nature et dose de l'antigène). Ces cellules peuvent être caractérisées phénotypiquement par la présence ou l'absence des molécules CD45RA, CCR7, et CD27 à leur membrane. Parmi les cellules T mémoires circulantes, on distingue :

- les lymphocytes T mémoires centraux (LT<sub>CM</sub>), qui sont CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>, n'ont pas de fonction effectrice, mais qui ont un fort potentiel prolifératif et constituent les précurseurs des cellules T effectrices secondaires en cas de réexposition à l'antigène,
- les lymphocytes T mémoires transitionnels (LT<sub>TM</sub>), qui sont CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>, qui correspondent à une population transitoire entre les LT<sub>CM</sub> et les LT<sub>EM</sub>,

- les lymphocytes T mémoires effecteurs ( $LT_{EM}$ ), qui sont  $CD45RA^- CCR7^- CD27^-$ , qui possèdent une grande capacité proliférative mais qui sont également capables de sécréter rapidement des cytokines et des molécules cytotoxiques dès leur activation,

- les lymphocytes T mémoires effecteurs très différenciés ( $LT_{EMRA}$ ), qui sont  $CD45RA^+ CCR7^- CD27^-$ , qui ont des capacités effectrices immédiates mais une capacité proliférative limitée.

Outre ces quatre sous-populations de cellules mémoires capables de circuler, le compartiment T mémoire comprend une cinquième sous-population, les lymphocytes T mémoires résidents des tissus non lymphoïdes ( $LT_{RM}$ ). Ces cellules qui résident dans les tissus épithéliaux périphériques constituent de par leur position stratégique une première barrière de protection en cas de réexposition à l'antigène (**Figure 19**). Elles dérivent principalement des cellules T mémoires effectrices entrées dans les tissus lors de la primo-infection qui se sont différenciées *in situ*. Les  $LT_{RM}$  sont  $CCR7^- CD45RA^-$  mais se distinguent des  $LT_{EM}$  par l'expression à leur surface de la molécule CD69 (une lectine, également marqueur d'activation).



**Figure 19 : Schéma des différentes zones de domiciliation et des voies de migration empruntées par les cellules T naïves et mémoires**

D'après « Immunologie fondamentale et immunopathologie », Collège des Enseignants d'Immunologie, 2<sup>ème</sup> édition, Elsevier Masson. OL II, organes lymphoïdes secondaires

**Deuxième partie : Physiopathologie et immunopathologie de l'infection par le****VIH-1****I. Généralités sur le VIH**

Le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA est une maladie infectieuse provoquée par le VIH. Ce virus est transmissible par les fluides corporels tels que le sang, les sécrétions vaginales, le sperme ou le lait maternel (Patel et al., 2014) (Tableau 1). La majorité des transmissions a lieu par voie sexuelle. Le risque peut être augmenté par la co-infection avec d'autres infections sexuellement transmissibles (Galvin and Cohen, 2004) ou diminué de 53% à 60% lors de relations hétérosexuelles chez les hommes circoncis (Tobian et al., 2014). L'infection par le VIH, qui peut d'abord se manifester par des signes généraux (fièvre, asthénie, amaigrissement, diarrhée, adénopathie, etc...), provoque à long terme un affaiblissement du système immunitaire qui se caractérise essentiellement par la survenue d'infections dites opportunistes (impliquant des agents microbiens ne devenant pathogènes que chez les sujets immunodéprimés et touchant divers organes, en premier lieu le poumon et le cerveau) et de cancers. Sans traitement, le SIDA entraîne la mort. La thérapie antirétrovirale (traitement contre le VIH/SIDA) ne permet pas de guérir de la maladie mais permet aux patients séropositifs pour le VIH de rester en bonne santé tant qu'ils prennent leur traitement.

Voie de transmission	Risque d'infection (%)	Intervalle de confiance à 95%
Transfusion sanguine	92,5	89,00-96,10
Transmission de la mère à l'enfant	22,6	17,0-29,00
Relation sexuelle anale réceptive	1,38	1,02-1,86
Partage de seringues à l'usage de drogues injectables	0,63	0,41-0,92
Piqûre d'aiguille percutanée	0,23	0,00-0,46
Relation sexuelle anale insertive	0,11	0,04-0,28
Relation sexuelle vaginale réceptive	0,08	0,06-0,11
Relation sexuelle vaginale insertive	0,04	0,01-0,14
Relation sexuelle orale insertive ou réceptive	faible	0,00-0,04

**Tableau 1 : Estimation de la probabilité par acte d'acquérir le VIH à partir d'une source infectée**

Modifié d'après Patel et al., 2014.

## 1. Découverte du SIDA et de son agent étiologique le VIH

C'est à Los Angeles, en 1981, que les premiers cas de SIDA sont diagnostiqués chez 5 jeunes homosexuels atteints de pneumocystose (CDC, 1981b). Cette même année et l'année suivante des cas de cancer (maladie de Kaposi) et des lymphoadénopathies généralisées non expliquées sont détectés aux USA chez des patients homosexuels ou bisexuels à Atlanta, New York et San Francisco (CDC, 1981a, 1982b), puis en Europe : tout d'abord en Angleterre (du Bois et al., 1981), puis en France (Rozenbaum et al., 1982) et au Danemark (Gerstoft et al., 1982). D'autres groupes à risques sont ensuite identifiés aux USA comme les utilisateurs de drogue par voie intraveineuse (Masur et al., 1981) et les hémophiles (CDC, 1982c). La prévalence de la maladie semble par ailleurs plus importante chez les Haïtiens (CDC, 1982a). Le risque de transmission par transfusion sanguine (CDC, 1982d) et par voie homosexuelle et hétérosexuelle (CDC, 1983) d'un agent infectieux supposé responsable du SIDA est alors avancé.

Parallèlement, entre 1979 et 1983, les premiers cas de SIDA sont identifiés en Belgique, en grande majorité chez des noirs africains vivant en Belgique ou venant d'Afrique Centrale pour se faire soigner, et n'appartenant pas aux groupes décrits à risques (homosexuels, utilisateurs de drogue par voie intraveineuse, hémophiles, transfusés, ou encore Haïtiens). Ces patients de classe socioéconomique aisée avaient pour pays d'origine majoritairement le Zaïre, mais aussi le Rwanda, le Burundi et le Tchad (Clumeck et al., 1984). De manière intéressante, aucun cas de SIDA n'est détecté dans la communauté nord-africaine pourtant plus nombreuse en Belgique que celle d'Afrique Centrale. Cette étude, ainsi que celle menée par Brunet et ses collaborateurs en France (Brunet et al., 1983) suggèrent alors que le SIDA est endémique en Afrique Centrale en 1983. Cette épidémie en Afrique centrale coïncide avec celle aux Etats-Unis. Une transmission de l'agent causant le SIDA par voie hétérosexuelle mais peut-être également par l'intermédiaire de matériel médical non à usage unique est alors envisagée en Afrique Centrale (Clumeck et al., 1984). Les prostituées sont également pointées comme le groupe à risque de transmission du VIH (Van de Perre et al., 1985).

L'agent infectieux responsable du SIDA est isolé en France en 1983 par Françoise Barré-Sinoussi de l'Institut Pasteur à partir d'un ganglion de patient atteint de SIDA et il est alors nommé LAV pour « lymphadenopathy associated virus » (Barre-Sinoussi et al., 1983). L'année suivante, le professeur Gallo et ses collègues du National Cancer Institute isolent également un rétrovirus chez plusieurs patients souffrant de SIDA et le nomment HTLV-III pour « Human T-cell Leukemia virus III » (Gallo et al., 1984). Des analyses montreront ensuite que ces deux rétrovirus correspondent en réalité à un seul et même virus qui prendra comme nom définitif virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en 1986 (Coffin et al., 1986).

Le VIH fait partie de la famille des retroviridae ou rétrovirus, qui sont des virus à ARN simple brin de polarité positive infectant les vertébrés, et qui sont caractérisés par la présence de l'enzyme transcriptase inverse. Cette enzyme permet la rétro-transcription de l'ARN en ADN afin d'être intégré ensuite dans le génome de la cellule hôte. Au sein des rétrovirus, le VIH appartient plus précisément au genre lentivirus qui a pour caractéristiques essentielles d'avoir une longue période d'incubation et d'être pathogène pour les cellules qu'il infecte.

En 1986, un deuxième VIH est isolé (Clavel et al., 1986), il sera appelé VIH-2. Même si le VIH-2 est endémique seulement en Afrique de l'Ouest (particulièrement en Guinée-Bissau et au Sénégal), il a réussi à se diffuser de façon limitée dans beaucoup de pays du monde. D'ailleurs, même si le VIH-2 est moins pathogène que le VIH-1, on estime que 1 à 2 millions des 36,9 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2017 sont infectés par le VIH-2, incluant ceux qui sont infectés par les deux virus (Gottlieb et al., 2018).

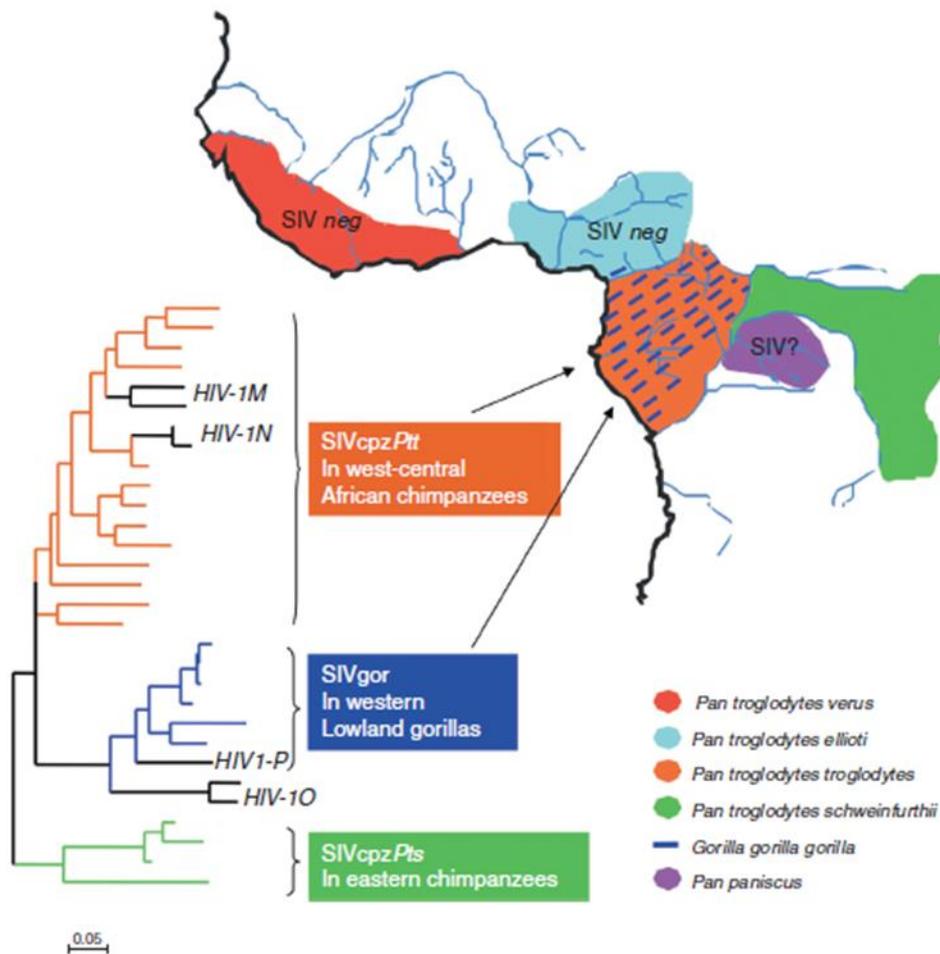
Les différents isolats du VIH-1 responsables de la pandémie sont assez proches génétiquement et ont donc été classés dans un groupe nommé M pour « main ». D'autres VIH-1 plus divergents génétiquement de celui isolé en 1983 ont été isolés en 1990, 1998 et 2009. Ils ont été classés respectivement comme faisant partie des groupes O (pour « outlier »), N (pour « non-M, non-O ») et P (De Leys et al., 1990; Plantier et al., 2009; Simon et al., 1998). Les virus du groupe O sont responsables d'une épidémie en Afrique Centrale de l'Ouest avec 100 000 infections (D'arc et al., 2015) tandis que les virus des groupes N et P ont infecté très peu de personnes. En effet, à ce jour on recense 20 personnes infectées par des virus du groupe N au Cameroun (Tagnouokam Ngoupo et al., 2018) et seulement 2 personnes d'origine camerounaise infectées par des virus du groupe P (Alessandri-Gradt et al., 2018).

## 2. Origine et variabilité du VIH

Les primates non-humains africains étant naturellement infectés par différents lentivirus, ils ont rapidement été suspectés comme étant la source du VIH. La mise en évidence de rétrovirus apparentés au VIH et nommés virus de l'immunodéficience simienne (VIS) au sein des espèces macaques (Daniel et al., 1985), singes verts (Kanki et al., 1985), puis chimpanzés (Peeters et al., 1989) a confirmé cette hypothèse. En 2012, Locatelli et Peeters faisaient état que 45 des 73 espèces de primates non-humains africains connues étaient infectées par un VIS, en précisant que de manière intéressante aucune infection par VIS n'était documentée chez les singes d'Asie ou d'Amérique du Sud (Locatelli and Peeters, 2012).

Il est maintenant bien établi que le VIH-2 provient d'une contamination inter-espèce entre le singe et l'homme. Plusieurs contaminations inter-espèces ont d'ailleurs eu lieu et la source simienne du virus a été identifiée comme étant le mangabey enfumé infecté par le VISsmm (Hahn et al., 2000).

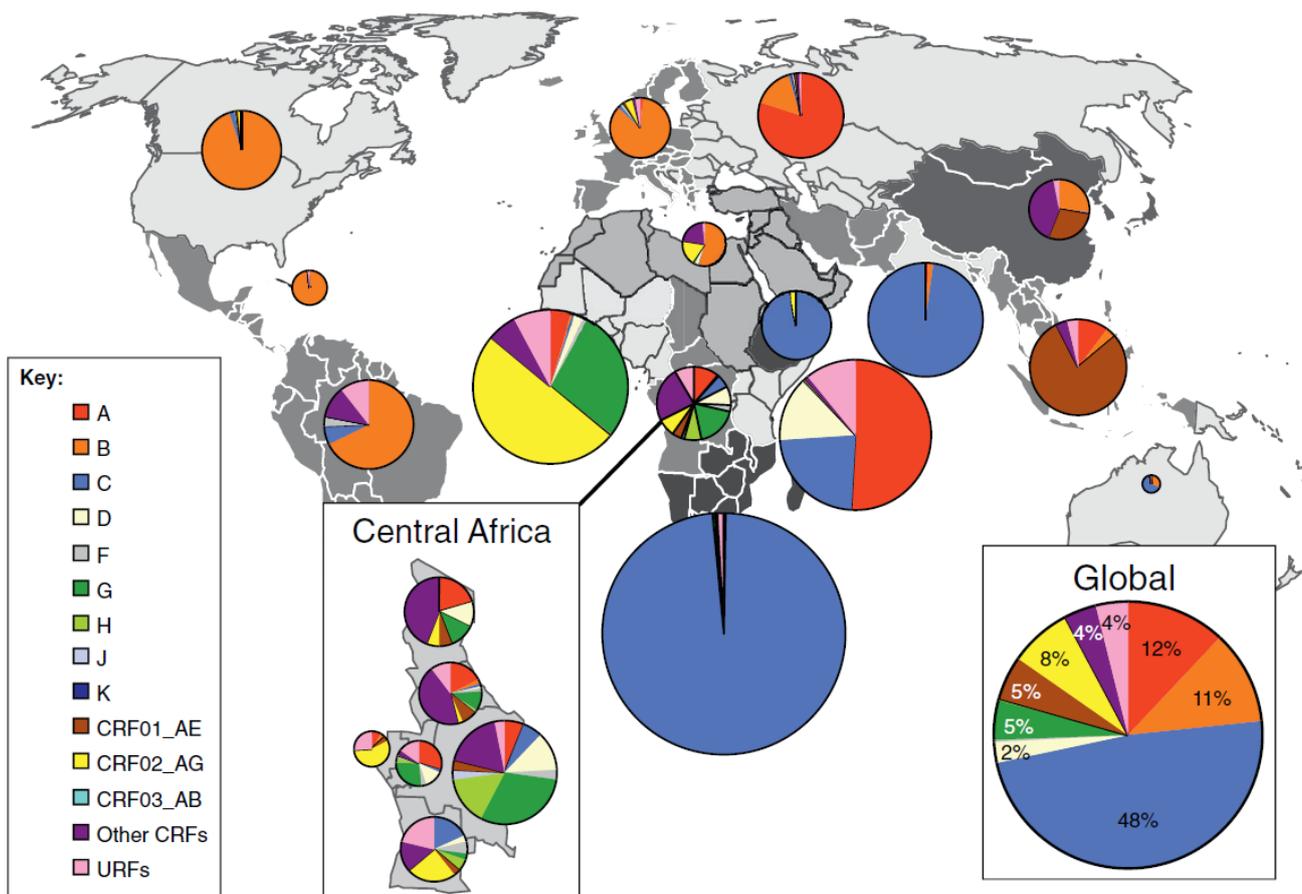
Concernant le VIH-1, 4 transmissions inter-espèces ont eu lieu. Le chimpanzé d'Afrique Centrale de l'Ouest de l'espèce *Pan troglodytes troglodytes* vivant au Cameroun et infecté naturellement par le VIScpzPtt a été identifié comme étant le réservoir naturel des groupes M et N (Keele et al., 2006). Par contre, le réservoir naturel des groupes P et O a été identifié comme étant le gorille de l'Ouest (*Gorilla gorilla gorilla*) vivant également au Cameroun (D'arc et al., 2015; Plantier et al., 2009) et infecté par un VISgor (Van Heuverswyn et al., 2006) (Figure 20).



**Figure 20 : Le VIH-1 dérive de VIS circulants chez des chimpanzés et des gorilles de l'Afrique Centrale de l'Ouest**

D'après Locatelli & Peeters, 2012.

Ce qui est frappant concernant les souches du groupe M du VIH-1, c'est que l'on observe une grande variabilité. En effet ces souches virales peuvent être classées en différents sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K). Certains de ces sous-types sont même divisés en sous-sous-types. La variation intra-sous-type en acides aminés est généralement de l'ordre de 8% à 17% alors que la variation inter-sous-type est généralement de l'ordre de 17% à 35% (Hemelaar, 2012). De plus, il existe de nombreuses formes recombinantes circulantes (CRF) et formes recombinantes uniques (URF) qui continuent à émerger. Le sous-type B est le plus répandu dans le monde alors que le sous-type C est responsable du plus grand nombre d'infections dans le monde. (Figure 21).



**Figure 21 : Distribution globale des sous-types et recombinants du VIH-1 du groupe M**

*D'après Hemelaar, 2012.*

Comme il est établi que les souches du groupe M du VIH-1 sont apparues suite à une seule transmission de VIScpz à l'homme (Hahn et al., 2000), l'origine de cette sous-structure phylogénétique reste obscure (Faria et al., 2014; Sharp et al., 1999). Le VIH est un virus qui mute beaucoup pour deux raisons : 1) à cause des erreurs commises par l'enzyme transcriptase inverse (Preston et al., 1988) ; 2) car ce virus possède un cycle de réplication rapide (Perelson et al., 1996).

Ces mécanismes entraînent la génération rapide de populations virales génétiquement distinctes (appelées quasi-espèces) au sein d'un même individu, cette variation pouvant atteindre 10% au niveau du gène de l'enveloppe du VIH. Pour bien se rendre compte du problème engendré par cette énorme diversité dans l'optique d'un vaccin anti-VIH, il faut savoir que la diversité des séquences du virus influenza (responsable de la grippe) dans le monde entier pour une année donnée équivaut approximativement à la diversité des séquences du VIH au sein d'un seul individu infecté à un temps donné (Korber et al., 2001). De plus, les possibles recombinaisons (Robertson et al., 1995) entre différents VIH-1 peuvent engendrer une variabilité encore plus importante. Cependant, ces raisons ne peuvent expliquer à elles seules l'apparition des 9 sous-types du VIH-1 du groupe M simultanément (Burr et al., 2001). Le fait que ces sous-types soient présents dans diverses régions du monde écarte l'hypothèse d'une spécificité des sous-types envers un type d'hôte en particulier (Myers, 1994). Toutefois, il a quand même été montré que la présence de mutations caractéristiques de l'échappement du virus au contrôle par les LT CD8<sup>+</sup> liées à certains allèles HLA était associée à un polymorphisme inter-sous-types et à un regroupement phylogénétique des séquences intra-sous-types (Matthews et al., 2009). L'hypothèse la plus probable de l'existence de ces différents sous-types est certainement celle suggérée par Lukashov et Goudsmith, à savoir qu'après l'introduction du VIS dans la population humaine, l'adaptation du virus à son nouvel hôte s'est faite dans plusieurs directions évolutives donnant naissance aux différents sous-types du VIH-1 représentant alors des niches génétiques séparées dans lesquelles la capacité répliquative des virus peut être maintenue (Lukashov and Goudsmit, 1997). Enfin, les différents groupes actuels du VIH-1 représentent certainement déjà des formes recombinantes de VIH-1 s'étant développées dans les années 1970 en Afrique Centrale lorsque le VIH-1 a pu atteindre les premières populations à risque comme les prostituées (Kalish et al., 2004).

Des études sur la diversité des séquences virales retrouvées au Zaïre (aujourd'hui République Démocratique du Congo) en 1984, 1986 et 1997 ont permis de suggérer fortement que ce pays soit l'épicentre de la pandémie du VIH-1 de groupe M (Kalish et al., 2004; Vidal et al., 2000). En plus des nombreuses séquences du VIH-1 isolées et étudiées depuis les années 1980-1990, 3 séquences datant de l'époque pré-épidémique du SIDA ont été isolées. La première à partir d'un échantillon de sérum datant de 1976 provenant d'une femme qui habitait un village du Nord-Ouest du Zaïre mais ayant également vécu à Kinshasa, entre 1971 et 1975 (Getchell et al., 1987). De manière intéressante, cette souche a été caractérisée comme étant un recombinant inter-sous-types A/G (Choi et al., 1997). La deuxième, qui est la plus ancienne, à partir d'un échantillon de sérum datant de 1959 provenant d'un homme qui vivait à Kinshasa (anciennement Léopoldville) (Zhu et al., 1998). Enfin plus récemment, une troisième séquence ancienne (fossile) du VIH-1 a été isolée à partir d'une

biopsie de ganglion datant de 1960 et provenant d'une femme qui vivait également à Kinshasa (Worobey et al., 2008). Au-delà du fait que l'existence de ces séquences prouve l'existence du VIH-1 à Kinshasa bien avant le début reconnu de l'épidémie de SIDA, l'utilisation de ces séquences et de nombreuses autres a permis, à l'aide de programmes informatiques utilisant le principe d'horloge moléculaire se basant sur le taux constant de mutations du VIH-1, d'estimer aux alentours de 1920 la date de l'ancêtre commun le plus récent entre tous les VIH-1 du groupe M (Faria et al., 2014; Worobey et al., 2008). L'ancêtre commun le plus récent partagé entre le groupe M du VIH-1 et le VIScpz a lui été estimé à 1853 (Wertheim and Worobey, 2009), ce qui implique que le transfert inter-espèce a dû avoir lieu entre 1853 et 1920.

### 3. Origine de la pandémie

S'il est maintenant bien acté que le VIH-1 du groupe M, responsable de la pandémie, provient d'une contamination inter-espèce entre le chimpanzé et l'homme, les conditions de ce transfert ne sont pas encore totalement expliquées (Djoko et al., 2012; Filippone et al., 2017). De plus, le transfert du VIScpz du chimpanzé à l'homme n'a pas permis à lui seul d'engendrer la pandémie de VIH-1 (Marx et al., 2004). En effet, les transmissions inter-espèces de VIS sont rendues difficiles par différents facteurs de restrictions limitant l'infectivité du virus transmis (Etienne et al., 2013; Kirmaier et al., 2010; Kluge et al., 2015; Sauter et al., 2009). Cela signifie qu'une fois avoir passé la barrière de l'espèce, le VIScpz a certainement dû s'adapter pour devenir le VIH-1 pathogène pour l'homme et pouvant être transmis au sein de la population humaine. Les injections non stériles (de pénicilline notamment) réalisées en Afrique à partir des années 1950 ont peut-être pu faciliter cette adaptation (Marx et al., 2001).

L'hypothèse actuelle concernant le transfert du virus du singe vers l'homme est une contamination d'un chasseur de viande de brousse : contamination par coupure et exposition au sang lors de la découpe de la viande, par morsure, voire consommation de viande pas assez cuite (Hahn et al., 2000). Selon cette hypothèse, un chasseur de brousse camerounais se serait infecté par un VIScpz dans les années 1900 puis il aurait rejoint la ville de Kinshasa au Zaïre par bateau (les connections fluviales entre le Sud-Est du Cameroun et Kinshasa étant fréquentes à l'époque, dû à l'exploitation du caoutchouc et de l'ivoire (De Sousa et al., 2012)) où il aurait ensuite commencé à disséminer ce virus devenu VIH-1. Une autre hypothèse concurrente, émise par Louis Pascal (Pascal, 1991), popularisé par le journaliste Tony Curtis (Curtis, 1992) puis reprise et développée par Edward Hooper (Hooper, 1999) plaçait l'origine de la pandémie dans l'utilisation de vaccins oraux contre la poliomyélite (OPV) potentiellement contaminés par du VIScpz au Zaïre à la fin des années 1950. Cette hypothèse a été

prise au sérieux notamment car il avait été montré que 10% à 30% des vaccins inactivés contre la poliomyélite injectés à 98 millions d'américains entre 1955 et 1963 avaient été contaminés par le virus simien SV40, potentiellement cancérigène, lors de la production des vaccins à partir de reins de macaques (Shah and Nathanson, 1976). Cependant, après le grand débat sur les origines du SIDA organisé par la Royal Society de Londres en 2000, confrontant l'hypothèse de Hooper avec les résultats de différents chercheurs, cette hypothèse a été rejetée (De Cock et al., 2001).

Plusieurs questions restent tout de même en suspens :

1) Puisque le singe est infecté depuis longtemps par le VIS et que l'homme chasse le singe depuis de très anciennes périodes en Afrique Centrale, pourquoi une pandémie de VIH-1 n'a pas eu lieu plus tôt ? La réponse est qu'un ensemble de facteurs est nécessaire au début d'une épidémie et en premier lieu la présence d'une agglomération urbaine. Des transmissions inter-espèces entre le singe et l'homme ont certainement eu lieu depuis des temps anciens mais dans des communautés isolées, ne permettant pas la diffusion du virus. Pour aller dans ce sens une étude a mis en évidence la sélection de facteurs génétiques associés à une protection contre l'infection par le VIH-1 ou sa progression dans une communauté Pygmée de chasseurs-cueilleurs d'Afrique Centrale de l'Ouest fréquemment en contact avec les chimpanzés potentiellement infectés par le VISpz (Zhao et al., 2012). Cette étude suggère que le génome de cette communauté a pu être façonné par des infections passées par des VIS ou des VIH.

2) On peut se demander également pourquoi le SIDA n'est pas devenu prévalent avant la fin des années 1970 si le VIH-1 était déjà présent chez l'homme à Kinshasa depuis 1920 ? La réponse apportée par Faria et ses collaborateurs est que, le VIH-1 s'est tout d'abord propagé lentement jusqu'aux années 1960 où a lieu un changement abrupt du nombre d'infections par le VIH-1 correspondant au début de l'épidémie en Afrique Centrale (Faria et al., 2014).

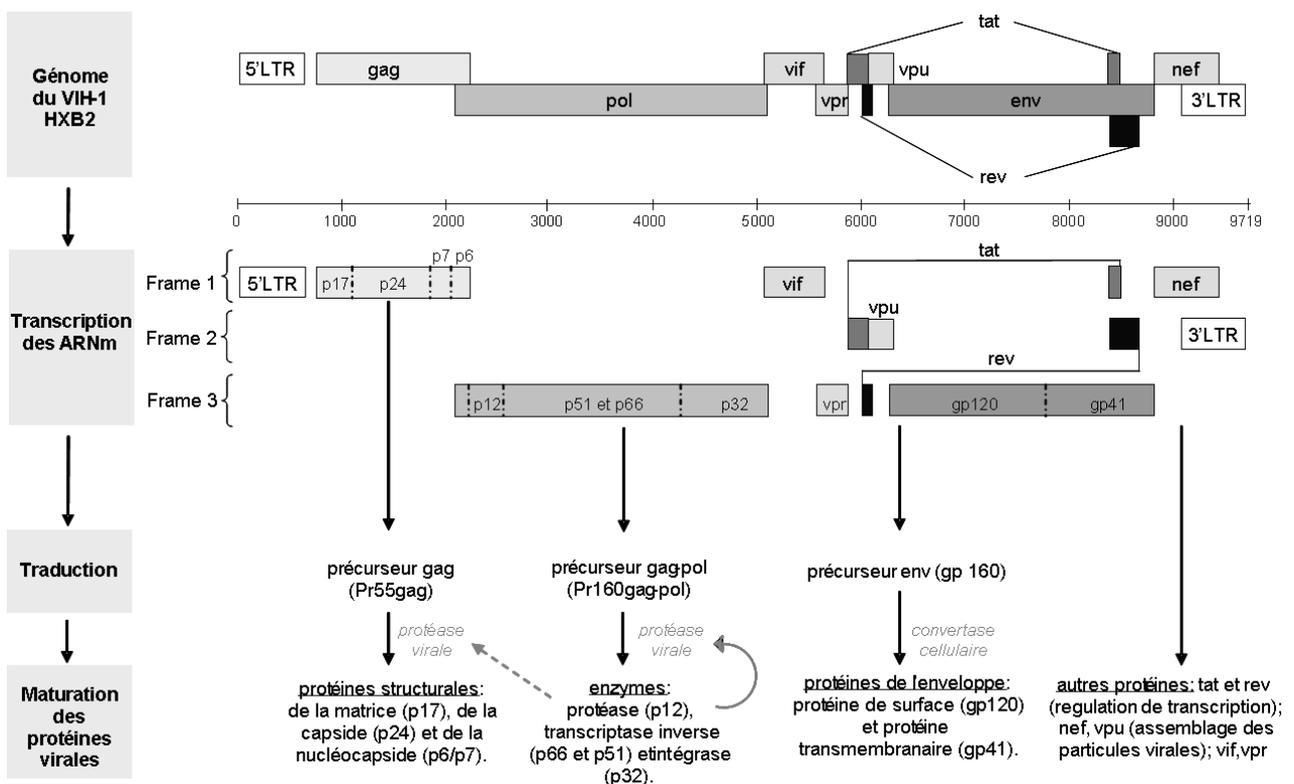
3) Quels sont donc les facteurs impliqués dans cette soudaine épidémie ? Ils sont multiples. En 1988, Nzilambi et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que les changements sociaux et comportementaux accompagnant l'urbanisation ont pu être des facteurs importants dans la dissémination du SIDA en Afrique Centrale (Nzilambi et al., 1988). En effet, Kinshasa connaît une très forte croissance démographique entre 1940 et 1960 (Chitnis et al., 2000), et devient la plus grosse agglomération d'Afrique centrale. Piot et ses collaborateurs émettent alors l'hypothèse qu'une fois introduit dans des populations où les individus ont tendance à avoir de nombreux partenaires sexuels, à être exposés à des transfusions sanguines et à des aiguilles et seringues non stérilisées, le VIH-1 a pu se disséminer rapidement (Piot et al., 1988). Les injections médicales et les transfusions sanguines sont d'ailleurs identifiées comme les facteurs de risques principaux pour les enfants

séropositifs nés de mères séronégatives pour le VIH-1 (Mann et al., 1986). Un autre facteur important ayant favorisé l'infection par le VIH-1 semble être la présence de co-infections avec d'autres maladies sexuellement transmissibles comme les gonorrhées, les ulcères génitaux et la syphilis (Greenblatt et al., 1988; Kreiss et al., 1986; Laga et al., 1993), fréquentes en Afrique (Osoba, 1981) et particulièrement chez les prostituées (D'Costa et al., 1985). De plus, les injections médicales non stériles réalisées chez les prostituées de Kinshasa pour lutter contre les maladies sexuellement transmissibles ainsi que le changement de type de prostitution (avec un nombre plus important de clients) à partir du début des années 1960 ont été mis en avant pour expliquer la croissance exponentielle du VIH-1 à Kinshasa (Pépin, 2011, 2012). Des études portant sur la prévalence de l'infection à VIH chez des chauffeurs routiers en Uganda (Carswell et al., 1989) et au Kenya (Bwayo et al., 1994) ont également confirmé leur rôle dans la propagation de l'épidémie aux pays voisins. Finalement, Gray et ses collaborateurs, auteurs d'une étude phylodynamique de l'émergence de l'épidémie de VIH-1 en Afrique de l'Est, concluent que l'accessibilité et les infrastructures apportant les facilités de déplacement sont certainement le facteur primordial ayant permis l'établissement et la propagation d'une épidémie comme celle du VIH-1 (Gray et al., 2009).

En 1984, Piot et ses collègues discutent le fait que plusieurs milliers de travailleurs Haïtiens soient venus au Zaïre à la fin de la période coloniale entre le début des années 1960 et le milieu des années 1970 (Piot et al., 1984). Une des hypothèses pouvant expliquer la sortie du VIH-1 hors d'Afrique est alors que parmi ces personnes, certaines se soient infectées et aient ensuite disséminé le virus en repartant d'Afrique. Cette hypothèse a ensuite été reprise pour expliquer les cas de SIDA observés à Haïti et ceux découverts chez les migrants haïtiens arrivés aux USA (Pitchenik, 1983; Vieira et al., 1983) et au Canada (Laverdiere et al., 1983; Leblanc et al., 1983). Cette hypothèse est également soutenue par Faria et ses collaborateurs pour expliquer l'arrivée du VIH-1 aux USA (Faria et al., 2014). Les dernières analyses phylogénétiques publiées reconstituant l'histoire du VIH-1 depuis son arrivée aux USA confirment cette hypothèse en datant l'arrivée à Haïti de la souche pandémique B du VIH-1 depuis le Zaïre en 1967, puis son introduction à New York en 1971, et ensuite sa diffusion de New York à San Francisco en 1976 (Worobey et al., 2016). Mais le VIH-1 est également sorti d'Afrique suite au retour de civils et de militaires cubains qui ont certainement contracté le virus pendant leur intervention en Angola pendant les années 1970 et 1980 (Cuevas et al., 2002; Torres-Anjel, 1992). Le sous-type B s'est ensuite rapidement répandu depuis les USA vers l'Europe, l'Asie, l'Amérique Latine et l'Australie (Junqueira and Almeida, 2016).

#### 4. Organisation génomique et structure du VIH-1

Le génome du VIH-1 est constitué en moyenne de 9700 nucléotides. Il comprend 9 gènes qui codent pour 15 protéines (**Figure 22**). Les gènes Gag (« group specific antigens »), Pol (polymérase) et Env (enveloppe) codent pour 3 polyprotéines qui sont ensuite protéolysées en protéines individuelles. Les 4 protéines de Gag : matrice (MA) p17, capsid (CA) p24, nucléocapsid (NC) p7 et p6, ainsi que les 2 protéines de Env : la gp120 de surface (SU) et la gp41 transmembranaire (TM) sont des composants structurant le virion (**Figure 23**). Les 3 protéines provenant du gène Pol : protéase (PR) p12, transcriptase inverse (RT) p66/p51 et intégrase (IN) p32 ont des fonctions enzymatiques essentielles et font aussi partie de la particule virale. Le VIH-1 encode également 6 protéines accessoires : Vif (« virion infectivity factor »), Vpr (« viral protein r »), Nef (« negative regulatory factor »), Vpu (« viral protein u »), Tat (« transactivator of transcription ») et Rev (« regulator of expression of virion proteins ») dont les 3 premières sont également retrouvées dans la particule virale (Frankel and Young, 1998).



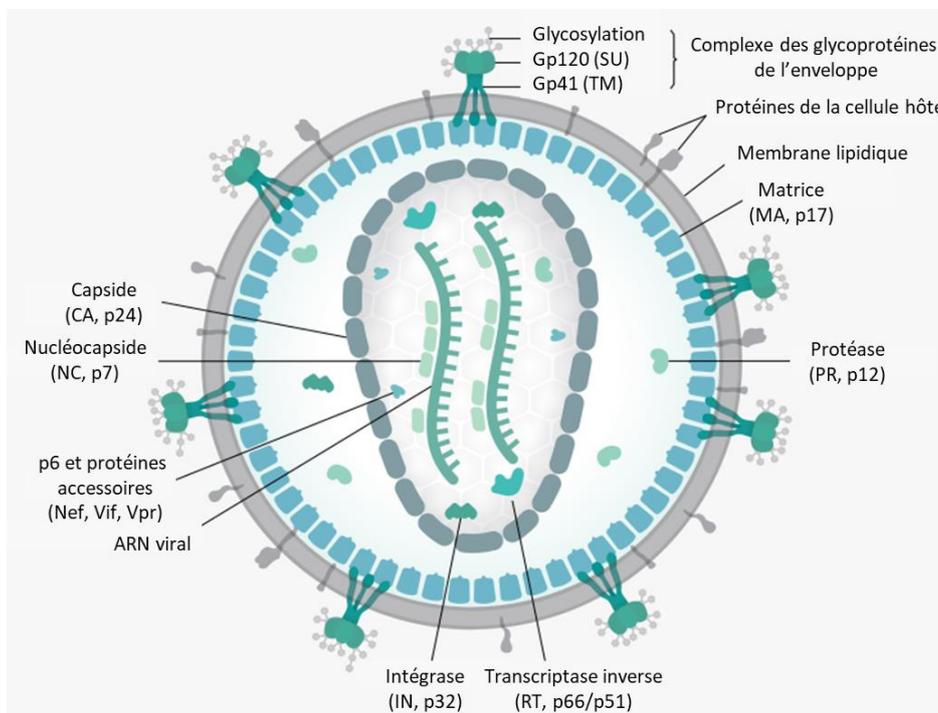
**Figure 22 : Organisation du génome du VIH-1 et expression des gènes**

D'après IMTG®, the international ImMunoGeneTics information system®, <http://www.imgt.org>, E. Gemrot, 2008.

Les protéines accessoires sont très importantes pour le VIH. Vif induit la dégradation par le protéasome du facteur cellulaire de restriction APOBEC3G (« Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Catalytic Subunit 3G »). Vpr permet la localisation nucléaire du complexe de pré-intégration mais

également l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que la dégradation de la protéine de réparation de l'ADN HLTF (« helicase-like transcription factor »). Nef augmente l'infektivité et la réplication virale et induit la diminution de l'expression des molécules CD4 et du CMH I à la surface des cellules infectées. Vpu dégrade la molécule CD4, induit la dégradation par le protéasome du facteur cellulaire de restriction téthérine, induit la diminution de l'expression des molécules du CMH I à la surface des cellules infectées et active également le bourgeonnement des nouveaux virions. Les protéines Tat et Rev ont quant à elles des fonctions régulatrices, elles permettent respectivement l'augmentation de la transcription des gènes viraux et le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme de la cellule hôte. Le génome du VIH-1 est également bordé par deux longues régions terminales répétées (LTR) permettant l'intégration du provirus dans le génome de la cellule cible puis sa transcription.

Le virion mature, qui comprend 2 molécules d'ARN viral, fait environ 110 nm de diamètre et comporte en moyenne seulement 14 complexes trimériques de glycoprotéines de l'enveloppe (Zhu et al., 2006). Il faut ajouter que la gp120 est une protéine extrêmement glycosylée (Myers and Lenroot, 1992), ce qui empêche notamment les anticorps d'accéder aux sites antigéniques de cette protéine (Back et al., 1994; Wei et al., 2003). Enfin, l'enveloppe du VIH étant constituée de la membrane plasmique de la cellule hôte, elle contient un grand nombre de protéines membranaires humaines (Figure 23).

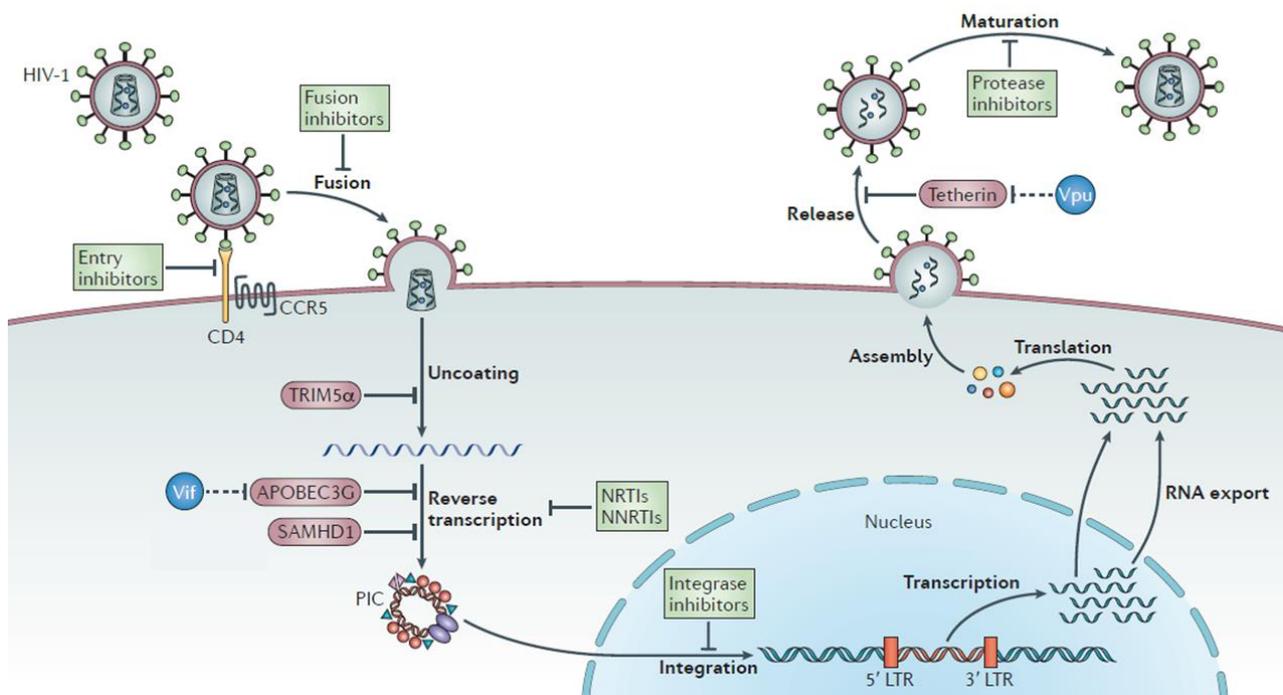


**Figure 23 : Structure du VIH-1**

Modifié d'après wikipedia HIV ; Thomas Spletstoesser ([www.scistyle.com](http://www.scistyle.com)).

## 5. Cycle réplcatif du VIH-1

La **Figure 24** résume les étapes du cycle réplcatif du VIH-1. Après liaison de la gp120 au CD4 et à son corécepteur, la membrane du virus va fusionner avec celle de la cellule cible, permettant ainsi l'entrée de la particule virale. Après décapsidation a lieu la rétrotranscription puis la formation d'un complexe de pré-intégration (PIC). La présence de la protéine virale Vpr permet l'import de ce PIC dans le noyau cellulaire. L'intégrase associée au PIC va ensuite permettre l'intégration du provirus dans l'ADN de la cellule cible. Suite à leur transcription, les ARNm viraux sont exportés vers le cytoplasme puis traduits en protéines ensuite incorporées dans une nouvelle particule virale en formation avec deux molécules d'ARN viral, c'est l'étape dite d'assemblage. Le bourgeonnement et le détachement du virion sont ensuite rapidement suivis de l'étape de maturation du virion médiée par la protéase virale et permettant la création d'une particule virale infectieuse. Les différentes étapes du cycle réplcatif du VIH-1 constituant des cibles pour les six familles de molécules utilisées dans la thérapie antirétrovirale (ART) administrée aux patients séropositifs (en vert), ou pour des facteurs de restriction de la cellule hôte (en rouge) qui sont contrecarrés par certaines protéines virales (en bleu), sont également identifiées sur cette figure (Barre-Sinoussi et al., 2013).



**Figure 24 : Cycle réplcatif du VIH-1**

Modifié d'après Barré-Sinoussi et al., 2013. APOBEC3G, « apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G » ; NNRTIs, inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ; NRTIs, inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ; PIC, complexe de pré-intégration ; SAMHD1, « SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1 » ; TRIM5α, « tripartite motif-containing protein 5 alpha ».

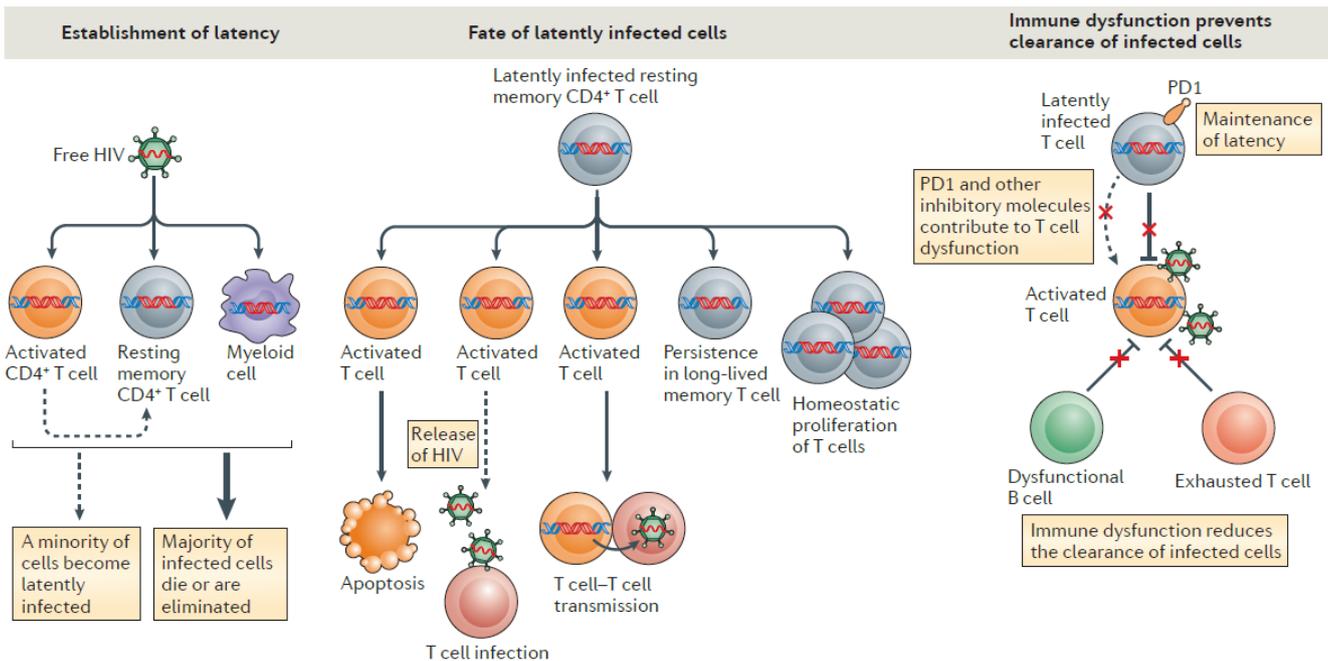
## 6. Tropisme et réservoir viral

Les cellules cibles du VIH-1 sont les cellules exprimant la molécule CD4 qui est le récepteur de la gp120. Il s'agit donc essentiellement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> tels que les HTL, les Treg et les TFH, mais également des monocytes et macrophages ainsi que certaines DC. L'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible nécessite également la présence d'un corécepteur. Deux corécepteurs principaux ont été caractérisés, il s'agit des molécules CCR5 et CXCR4, également présentes à la surface des LT CD4<sup>+</sup>, monocytes/macrophages et DC (Lee et al., 1999). Le corécepteur CXCR4, ayant pour ligand la chimiokine SDF-1 (« stromal cell-derived factor 1 » ou CXCL12) et la cytokine MIF (« Macrophage migration inhibitory factor »), est exprimé par 95% des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et 44% des LT CD4<sup>+</sup> mémoires du sang circulant. Le corécepteur CCR5, ayant pour ligand les chimiokines MIP-1 $\alpha$  (« macrophage inflammatory protein 1-alpha » ou CCL3), MIP-1 $\beta$  (« macrophage inflammatory protein 1-beta » ou CCL4) et RANTES (« regulated on activation, normal T cell expressed and secreted » ou CCL5), est lui exprimé par seulement 9% des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et 35% des LT CD4<sup>+</sup> mémoires du sang circulant (Blaak et al., 2000). De plus, CCR5 est particulièrement exprimé à la surface des LT activés (Ostrowski et al., 1998). Il a été identifié des virus utilisant le corécepteur CXCR4, infectant essentiellement des LT CD4<sup>+</sup> (tropisme dit X4 ou « T-tropic »), d'autres utilisant le corécepteur CCR5, pouvant infecter les macrophages (tropisme dit R5 ou « M-tropic »), et d'autres utilisant les 2 (« dual tropic »). De manière intéressante et non expliquée, les virus R5 sont retrouvés tout au long de l'infection alors que les virus X4 n'apparaissent généralement qu'au stade tardif de la maladie, entraînant une accélération de la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> et une progression plus rapide vers le stade SIDA (Schuitemaker et al., 1992; Verhofstede et al., 2012).

Le VIH-1 infecte préférentiellement des LT CD4<sup>+</sup> mémoires (Schnittman et al., 1990). Cependant, il a récemment été montré que le métabolisme cellulaire était un facteur conduisant à l'infection des LT CD4<sup>+</sup> plus important que l'état de différenciation et/ou d'activation de la cellule, et que les cellules ayant une forte activité métabolique étaient plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 (Valle-Casuso et al., 2019). En effet, plusieurs étapes précoces du cycle répliatif du VIH-1 sont dépendantes de la glycolyse. Il a été montré que l'induction de l'expression du transporteur de glucose GLUT1 médiée par l'IL-7 était associée à la permissivité de l'infection par le VIH-1 dans les LT CD4<sup>+</sup> et les thymocytes (Loisel-Meyer et al., 2012), pouvant ainsi expliquer l'infection productive des cellules mémoires quiescentes. De manière générale, ces cellules sont infectées par le VIH-1 mais ne peuvent pas produire de virus car l'étape de transcription inverse est bloquée par le facteur de restriction SAMHD1 (« SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1 ») qui hydrolyse le pool intracellulaire de dNTP (désoxynucléotidetriphosphate), diminuant leur concentration sous le seuil nécessaire à la synthèse de l'ADN complémentaire (Pan et al., 2013).

Cependant, une faible proportion des LT CD4<sup>+</sup> mémoires quiescents à longue durée de vie vont être infectés par le VIH-1 et vont intégrer dans leur génome l'ADN viral (Chomont et al., 2009). Ces cellules qui ne produisent pas de virus à l'état basal ne vont donc pas être reconnues par les CTL. Il a été montré chez des patients infectés par le VIH-1 que ces cellules constituaient un réservoir viral réfractaire au traitement antiviral (Finzi et al., 1997). Différents sites anatomiques réservoirs comprenant ces cellules ont été décrits comme le cerveau et le système nerveux central, le tractus gastro-intestinal, les GALT (« gut-associated lymphoid tissue » ou tissus lymphoïdes associés au tube digestif) et autres organes lymphoïdes ou encore le tractus génital (Mzingwane and Tiemessen, 2017).

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer comment ces cellules permettent la persistance du VIH-1 pendant la thérapie antirétrovirale (International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure et al., 2012) (Figure 25). De plus, le VIH va également se répliquer à faible niveau dans certains sites anatomiques difficilement accessibles aux molécules antivirales comme les ganglions lymphatiques (Fletcher et al., 2014).

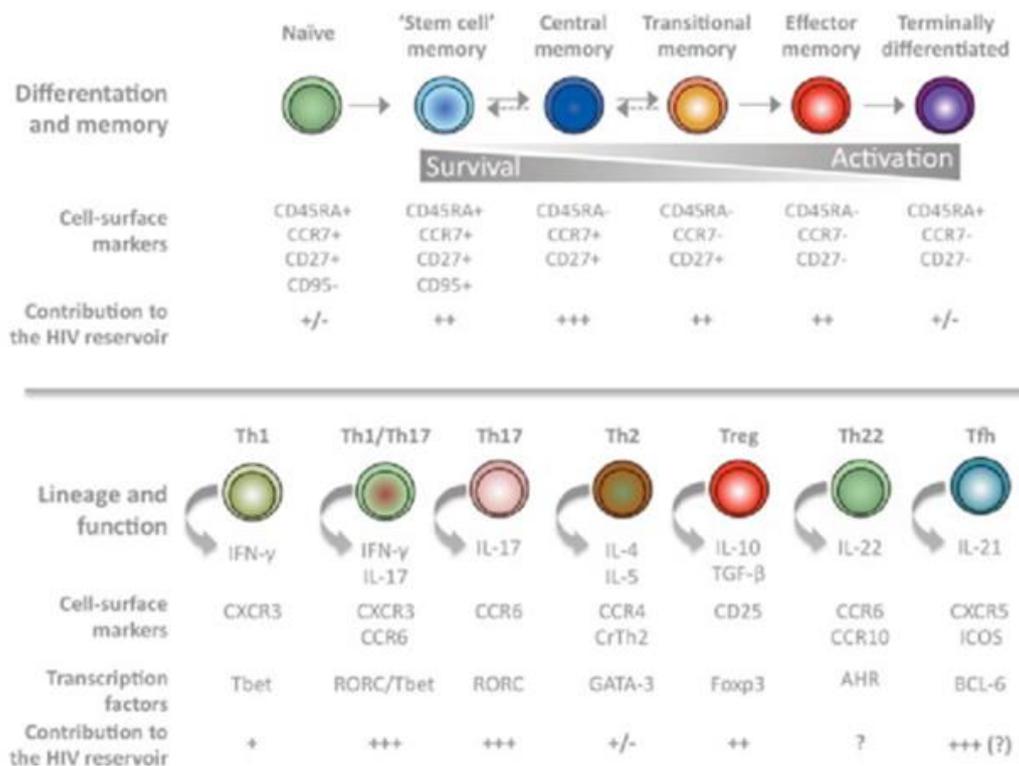


**Figure 25 : Les mécanismes de persistance du VIH-1 sous traitement antirétroviral**

D'après The International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, 2012. **La partie gauche** montre l'établissement d'une infection latente par le VIH dans des LT CD4<sup>+</sup> et des cellules myéloïdes réservoirs. L'infection de LT CD4<sup>+</sup> activés mémoires représente certainement le mécanisme principal de l'établissement du réservoir. La plupart de ces cellules vont mourir mais une minorité va revenir à l'état quiescent et devenir infectée de façon latente. **La partie centrale** montre le destin de ces LT CD4<sup>+</sup> mémoires quiescents infectés de manière latente. Ces cellules vont soit mourir lentement ou devenir une source de nouvelles infections en se réactivant, soit persister à long terme ou proliférer par des mécanismes homéostatiques en restant quiescentes. **La partie droite** montre certains mécanismes contribuant à la persistance de ces cellules comme l'augmentation de l'expression de la molécule PD1 qui permet de maintenir l'état de quiescence et participe à la dysfonction immunitaire observée sous traitement antirétroviral et qui réduit probablement l'efficacité d'élimination des cellules infectées.

Des études ont été menées afin d'estimer la vitesse de mise en place de ce réservoir viral et il a notamment été montré chez des macaques ayant subi une infection intrarectale par le VIS que seulement 3 jours après l'infection, le réservoir était déjà constitué (Whitney et al., 2014). D'ailleurs, il a récemment été montré que le rebond viral était inévitable après l'arrêt du traitement antirétroviral même chez des patients infectés par le VIH-1 ayant initié ce traitement très rapidement après l'infection (dans les 15 jours suivant l'infection, stade Fiebig I) et traités pendant environ 3 ans (Colby et al., 2018).

Concernant la nature des différentes cellules constituant le réservoir, les LT<sub>CM</sub>, les LT<sub>TM</sub> (mémoires transitionnels, qui se différencient des LT<sub>EM</sub> par l'expression du marqueur CD27), les LT<sub>EM</sub> et les cellules souches T CD4<sup>+</sup> mémoires récemment décrites sont les principales sources de virus répliquatif (Kulpa D. A. and N., 2015). Lorsque ces cellules sont étudiées en fonction de leurs facteurs de transcription, des récepteurs aux chimiokines qu'elles expriment, ainsi que des cytokines qu'elles sécrètent, les Th17, les Treg, ainsi que les TFH représentent les cellules réservoirs du VIH-1 préférentielles chez les individus dont la charge virale est indétectable (Figure 26). En effet, chez les patients traités n'ayant pas de charge virale plasmatique détectable, les TFH mais également les LT CD4<sup>+</sup> exprimant la molécule PD1 ont été identifiés comme responsables de la transcription résiduelle du VIH-1 (Banga et al., 2016).

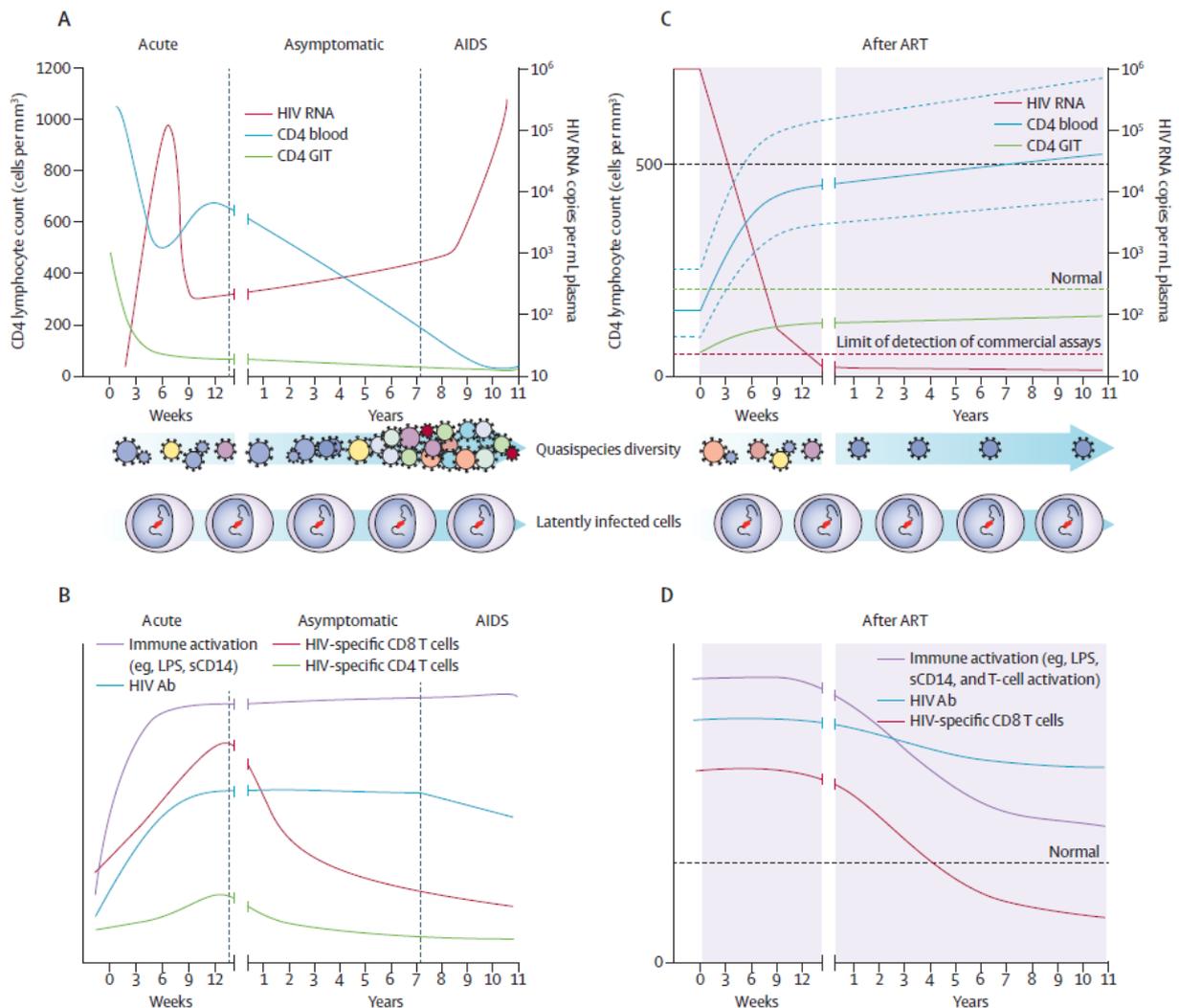


**Figure 26 : Contribution des différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> au réservoir VIH-1 sous traitement antirétroviral**

D'après Kulpa & Chomont, 2015.

## 7. Les différentes phases de l'infection

Le mécanisme central par lequel le VIH-1 induit l'immunodéficience est donc la déplétion des LT  $CD4^+$ , qui sont le maillon central de la réponse immunitaire adaptative. L'infection par le VIH-1 va se traduire par une évolution lente, qui sans traitement se déroule en 3 phases. La **Figure 27** décrit ces 3 phases ainsi que les changements observés après l'initiation de la thérapie antirétrovirale (ART) (Maartens et al., 2014).

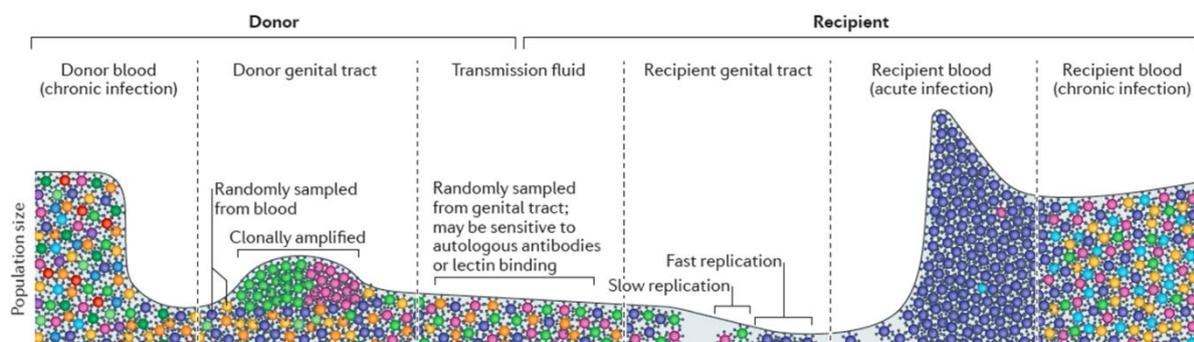


**Figure 27 : Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1 non traitée et changements observés sous traitement antirétroviral**

D'après Maartens et al., 2014. **A.** Dans l'infection par le VIH-1 non traitée, les LT  $CD4^+$  du sang périphérique sont déplétés progressivement tandis que ceux du tractus gastro-intestinal le sont rapidement. **B.** Lors de la réponse immunitaire anti-VIH-1 de la phase aiguë, on observe une augmentation importante des marqueurs de l'activation immunitaire, la production d'anticorps non-neutralisants, et les réponses T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  spécifiques du VIH-1 sont associées temporellement avec la diminution de la charge virale plasmatique. **C.** Sous traitement antirétroviral, le taux d'ARN viral plasmatique diminue significativement. Parallèlement, le taux de LT  $CD4^+$  du sang périphérique remonte au-dessus des 300 cellules / $\mu$ l alors que la récupération du taux de de LT  $CD4^+$  gastro-intestinaux est limitée. **D.** Avec la réduction de la charge virale et des antigènes viraux, les réponses T spécifiques du VIH-1 diminuent sous traitement antirétroviral alors que la réponse anticorps persiste chez les patients. L'activation immunitaire diminue également mais reste élevée en comparaison avec des individus sains. GIT, tractus gastro-intestinal ; LPS, lipopolysaccharide.

Les premières semaines qui suivent l'entrée du virus dans l'organisme correspondent à la phase de primo-infection ou phase aiguë de l'infection. Quelle que soit la voie (muqueuse ou sanguine) ayant permis la pénétration du virus dans l'organisme, ce-dernier va se localiser rapidement (environ 1 semaine) dans les ganglions lymphatiques (Pantaleo et al., 1994). La localisation du VIH-1 dans les ganglions lymphatiques va engendrer une série d'événements caractéristiques d'une réponse immunitaire adaptative classique (activation des LB, LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup>). Cependant, ce processus va également contribuer à la diffusion initiale du virus.

En effet, l'activation immunitaire va générer un pool de cellules cibles pour le VIH-1 (LT CD4<sup>+</sup>). C'est durant cette phase précoce (entre la deuxième et la quatrième semaine après l'infection) précédant la génération d'une réponse immunitaire anti-VIH-1 compétente que le virus va se disséminer aux autres organes lymphoïdes, et notamment aux GALT. Les organes lymphoïdes secondaires contiennent plus de 60% des lymphocytes du corps (Trepel, 1974) et l'intestin est l'organe qui possède la plus grande masse de tissu lymphoïde du corps humain (Salminen et al., 2007). De plus, les cellules mononuclées de la muqueuse intestinale expriment particulièrement les deux corécepteurs du VIH-1 (Poles et al., 2001), ce qui en fait des cibles préférentielles pour le VIH-1. Durant la primo-infection, les LT CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> mémoires du tractus gastro-intestinal sont massivement déplétés (Guadalupe et al., 2003; Mehandru et al., 2004). Les raisons pour lesquelles, quel que soit le mode de contamination, l'infection est quasiment toujours due à un virus de type R5, ne sont pas encore vraiment clarifiées (Moore et al., 2004). La capacité des DC à capter le VIH-1 via la molécule DC-SIGN (« dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin ») et à le transmettre aux LT CD4<sup>+</sup> activés exprimant particulièrement CCR5 dans les organes lymphoïdes est une des hypothèses évoquées pour les transmissions muqueuses (Geijtenbeek et al., 2000). Quoi qu'il en soit, la population virale initiale est génétiquement homogène après une transmission muqueuse car elle est établie à partir d'un unique génotype viral capable de se répliquer efficacement : le virus responsable de l'infection initiale ou « transmitted founder virus » (T/F) (Joseph et al., 2015). La population virale va ensuite se diversifier en phase chronique de l'infection (Figure 28).



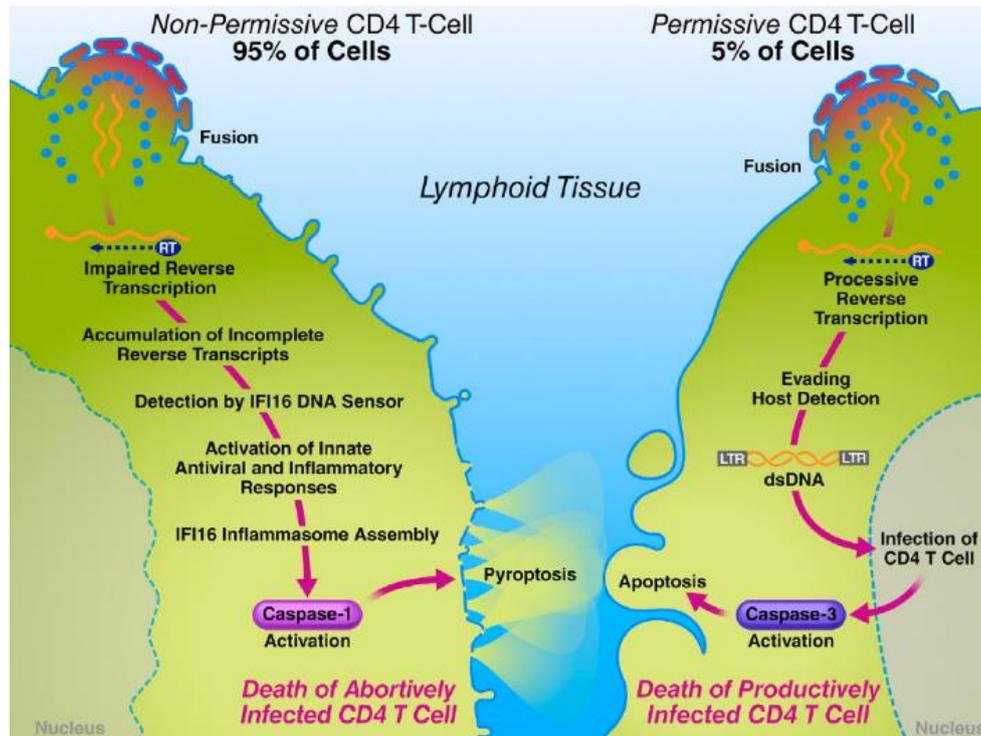
**Figure 28 : La transmission du « transmitted/founder virus »**

D'après Joseph et al., 2015.

Le pic de réplication virale, mesuré par la quantité d'ARN viral dans le sang périphérique (charge virale plasmatique), est atteint aux alentours de la troisième semaine de l'infection (Little et al., 1999) avec plusieurs millions de copies/ml. Du fait de l'action du système immunitaire et notamment de la réponse lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>, la réplication virale diminue ensuite progressivement pendant plusieurs mois. La charge virale plasmatique va alors se stabiliser (pendant plusieurs années) à un niveau variable selon les individus et qui est prédictif du délai de progression vers le stade SIDA en l'absence de traitement : le « viral set point ». Plus la charge virale plasmatique est élevée, plus l'évolution vers la maladie est rapide (Mellors et al., 1996).

À cette phase initiale fait suite une phase dite asymptomatique (ou d'infection chronique) car associée à très peu de manifestations cliniques. Durant cette phase, qui dure une dizaine d'année en moyenne, le système immunitaire est en lutte perpétuelle avec le virus et la réponse immunitaire (détaillée plus loin) permet de limiter la réplication virale dans le sang périphérique. Cependant, la réplication du virus continue de manière importante dans les organes lymphoïdes secondaires constituant un réservoir viral (Pantaleo et al., 1991). En effet, les particules virales piégées sous forme d'immuns complexes liés au complément par le réseau de FDC des centres germinatifs des ganglions lymphatiques représentent une source perpétuelle d'infection pour les LT CD4<sup>+</sup> migrants dans les organes lymphoïdes secondaires (Pantaleo and Fauci, 1996). Ces LT CD4<sup>+</sup> vont être infectés de manière latente, permettant ainsi au VIH-1 de persister dans ces cellules et de se disséminer malgré la surveillance immunitaire (Embretson et al., 1993), mais également de manière productive en libérant du virus (Hufert et al., 1997). D'ailleurs plus récemment, il a été montré chez des patients virémiques, que les TFH isolés de ganglions lymphatiques étaient les cellules T CD4<sup>+</sup> supportant majoritairement l'infection, la réplication et la production du VIH-1 (Perreau et al., 2013). La réplication virale persistante et l'activation immunitaire chronique entraînent la destruction progressive des tissus lymphoïdes, la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> infectés mais également l'apoptose des LT naïfs des ganglions lymphatiques (Pantaleo and Fauci, 1996; Zeng et al., 2012). De manière intéressante, il a été montré assez tôt que la plupart des cellules mourant par apoptose dans les ganglions lymphatiques n'étaient pas infectés de manière productive (Finkel et al., 1995). Il a été montré récemment comment, contrairement aux LT CD4<sup>+</sup> infectés de manière productive qui meurent par apoptose médiée par la caspase-3, la majorité des LT CD4<sup>+</sup> des tissus lymphoïdes, qui ne sont pas infectés de manière productive, meurt par un mécanisme différent générant de l'inflammation et nommé pyroptose, médié par la caspase-1 (Doitsh and Greene, 2016) (**Figure 29**). Le virion libre ne peut pas activer le mécanisme de pyroptose qui nécessite obligatoirement une transmission du virus de cellule à cellule.

Les LT CD4<sup>+</sup> infectés meurent donc par apoptose due au virus ou à l'action des CTL alors que les cellules infectées de manière non productive des tissus lymphoïdes vont mourir par pyroptose. Les LT du sang périphérique non infectés, présentant un niveau élevé de marqueurs d'activation, vont mourir par apoptose (Ameisen, 1992).



**Figure 29 : Rôle de la pyroptose et de l'apoptose dans la mort des LT CD4<sup>+</sup> du tissu lymphoïde**

D'après Doitsh & Greene, 2016.

Le besoin de renouvellement important de LT CD4<sup>+</sup> va alors engendrer l'épuisement de la lymphopoïèse (Sauce et al., 2011). Ces différents mécanismes sont responsables de la déplétion progressive des LT CD4<sup>+</sup> de l'organisme observée pendant cette phase chronique de l'infection. En effet, le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants baisse régulièrement jusqu'à arriver au seuil critique des 200 cellules / $\mu$ l de sang caractéristique du stade SIDA. De manière intéressante, il a été montré que la progression de la maladie était associée avec un changement de tropisme des virus circulants (Schuitemaker et al., 1992; Verhofstede et al., 2012). En effet, les virus vont généralement évoluer en souches X4 pouvant ainsi infecter productivement les LT CD4<sup>+</sup> naïfs exprimant le corécepteur CXCR4 (Blaak et al., 2000) mais également éliminer les cellules non infectées productivement par apoptose et/ou pyroptose (Doitsh et al., 2010; Jekle et al., 2003; Lelièvre et al., 2004).

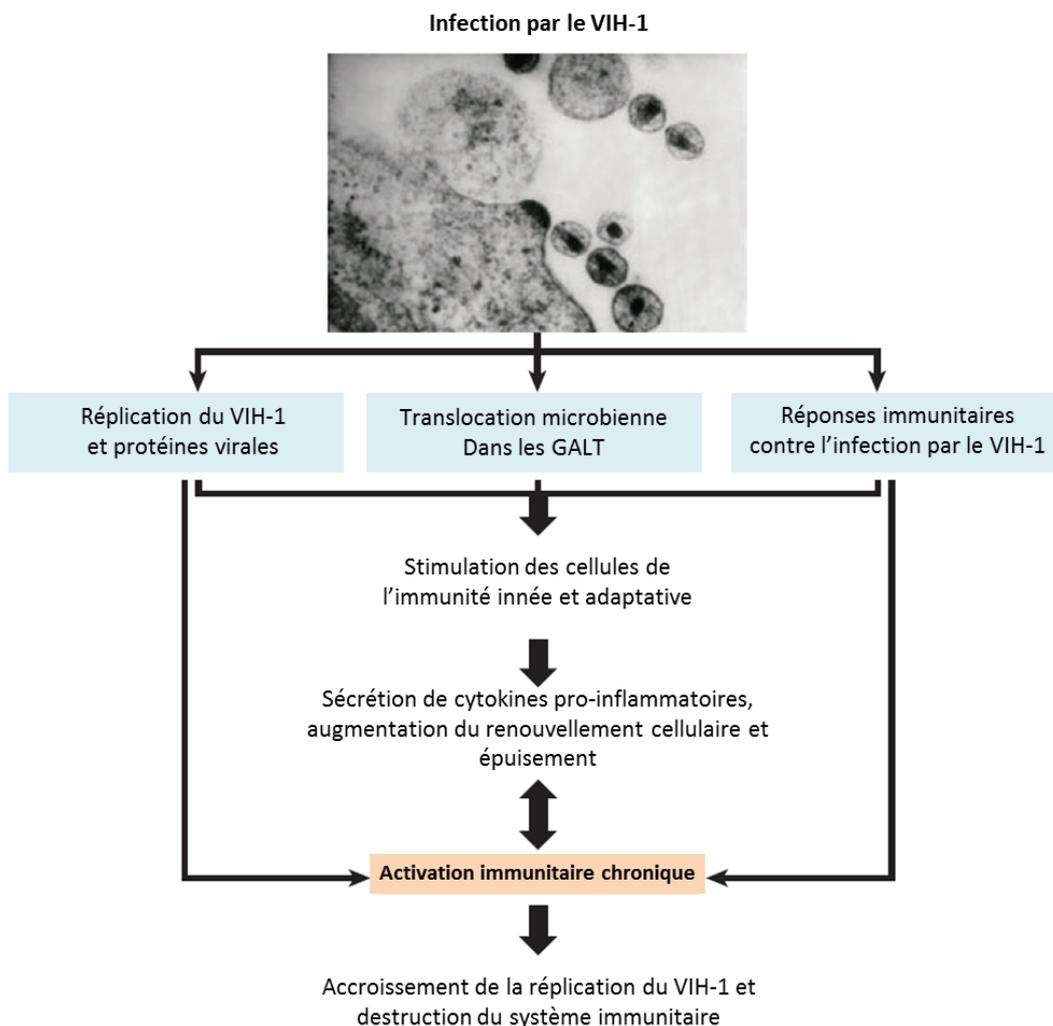
Au stade SIDA, la charge virale augmente de nouveau dans le plasma jusqu'à des niveaux proches de ceux observés dans les ganglions lymphatiques (Pantaleo and Fauci, 1996). En effet, suite à la destruction de l'architecture des ganglions lymphatiques, l'induction et/ou le maintien de réponses immunitaires effectrices n'est plus possible. Le virus produit par les cellules infectées augmente et se répand dans la circulation sanguine. La lymphopénie T CD4<sup>+</sup> aboutit à un état d'immunodépression principalement cellulaire, mais également humoral. Ceci conduit à une susceptibilité accrue à la réactivation de pathogènes intracellulaires ayant déjà infecté l'individu et persistant de manière latente comme la tuberculose, la toxoplasmose ou le CMV. Le risque de tumeurs viro-induites comme le Sarcome de Kaposi ou le lymphome à EBV est également élevé. Les infections dites opportunistes comme la pneumocystose apparaissent, entraînant la mort de l'individu. La survie moyenne au stade SIDA est de 2 à 3 ans.

L'initiation d'un traitement antirétroviral composé de différentes molécules capables de bloquer le cycle viral du VIH-1 à plusieurs étapes (Figure 24) permet une diminution très importante de la charge virale plasmatique jusqu'à son indétectabilité (Figure 27). Cependant, il a été montré que même sous ART le VIH-1 continuait à se répliquer et à reconstituer le réservoir du tissu lymphoïde (Lorenzo-Redondo et al., 2016). D'ailleurs, si le taux de LT CD4<sup>+</sup> du sang périphérique remonte bien au-dessus des 300 cellules / $\mu$ l sous traitement, la récupération du taux de de LT CD4<sup>+</sup> gastro-intestinaux est limitée. Avec la réduction de la charge virale et des antigènes viraux, les réponses T spécifiques du VIH-1 diminuent alors que la réponse anticorps persiste chez les patients. L'activation immunitaire diminue également mais reste élevée en comparaison avec des individus sains.

## 8. L'activation chronique induite par l'infection

Une des caractéristiques de l'infection par le VIH-1 est l'induction d'une activation immunitaire chronique (Figure 30). Celle-ci est déclenchée par plusieurs événements. Dès la pénétration du VIH-1 dans l'organisme, les cellules de l'immunité innée s'activent et induisent la sécrétion d'une multitude de cytokines et chimiokines pour lutter contre l'infection : c'est l'orage cytokinique (Stacey et al., 2009). On observe notamment la présence d'IP10 (« interferon-inducible protein 10 »), d'IL-15, de TNF $\alpha$  et d'IFN $\alpha$ . Certaines protéines virales vont également directement participer à l'activation du système immunitaire (Fortin et al., 2004). La déplétion préférentielle des LT CD4<sup>+</sup> du tractus gastro-intestinal pendant toutes les phases de l'infection par le VIH-1 (Brenchley et al., 2004) va entraîner une perturbation de l'homéostasie de l'intestin se traduisant par une translocation bactérienne participant à l'activation immunitaire systémique chronique (Brenchley et al., 2006; Sandler and Douek, 2012). Le fait que le VIH-1 ne soit jamais totalement éliminé de l'organisme va engendrer une

activation chronique au niveau des tissus lymphoïdes qui vont être détruits (Pantaleo and Fauci, 1996; Zeng et al., 2012) mais également une activation au niveau systémique. L'étude du phénotype des LT des patients infectés par le VIH-1 a montré très tôt une association entre l'augmentation des marqueurs d'activation HLA-DR et CD38 sur les LT CD8<sup>+</sup> et la chute du nombre de LT CD4<sup>+</sup> et le développement du SIDA (Giorgi and Detels, 1989). Plus tard cette relation a été renforcée et il a été montré que le niveau d'activation des LT CD8<sup>+</sup>, mesuré par le niveau d'expression de la molécule CD38 à la fin de la phase aiguë de l'infection, prédisait la vitesse à laquelle les LT CD4<sup>+</sup> allaient être déplétés dans le temps (Deeks et al., 2004). Cette activation chronique des LT va avoir des conséquences sur les réponses immunitaires dont nous discuterons plus loin (Moir et al., 2011).



**Figure 30 : Facteurs associés à l'activation immunitaire induite par le VIH-1**

Modifié d'après Moir et al., 2011.

Cette activation chronique associée à une inflammation systémique peut être mesurée par plusieurs marqueurs plasmatiques. Il a notamment été montré que la CRP (protéine C-réactive) et l'IL-6 (marqueurs d'inflammation), les D-dimères (marqueur de coagulation) ainsi que l'acide hyaluronique (marqueur de fibrose tissulaire) étaient associés à un risque élevé de SIDA ou de mort chez des patients non traités (Boulware et al., 2011).

Malgré la mise sous ART, l'activation et l'inflammation systémique persistent en partie chez les patients infectés par le VIH-1 (Hattab et al., 2015). D'ailleurs, il a été montré que les niveaux de marqueurs d'intégrité de la barrière épithéliale de l'intestin («intestinal fatty acid binding protein » ou IFABP et zonuline-1), de l'activation immunitaire innée (CD14 soluble, ratio Kynurénine/tryptophane), de l'inflammation (TNF $\alpha$  et CRP) et de la coagulation (D-dimères) étaient prédictifs de la mortalité chez les patients infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral (Hunt et al., 2014). De plus, la persistance de taux élevés de cytokines pro-inflammatoires va engendrer un vieillissement viscéral accéléré (ostéoporose, athérosclérose, troubles cognitifs...) nommé « inflammaging » (Appay and Sauce, 2008).

### 9. Profils particuliers

Les conséquences d'une exposition au VIH-1 ne sont pas les mêmes pour tout le monde. Certaines personnes hautement exposées au virus ne vont pas s'infecter, il s'agit des HESN (« highly exposed seronegative subjects ») (Fowke et al., 1996). Parmi les personnes qui vont contracter le virus, 70 à 80% des individus développent un SIDA 6 à 10 ans après le début de l'infection alors que 10 à 15%, les progresseurs rapides (RP ou « rapid progressor »), vont évoluer en 2-3 ans vers le stade SIDA (Langford et al., 2007). Enfin, d'autres ne vont pas progresser vers la maladie. Cette catégorie de personne est divisée en 2 groupes : les non progresseurs à long terme (LTNP ou « long-term non progressors ») qui sont caractérisés par une charge virale détectable et un taux de LT CD4<sup>+</sup> >500 cellules/ $\mu$ l, et les contrôleurs chez qui le virus est bien contrôlé avec une charge virale <50 copies/ml (EC ou « elite controllers »). Les LTNP représentent globalement 2% à 15% des patients infectés par le VIH-1 alors que les EC en représentent moins de 1% (Okulicz, 2012). Ces différents groupes sont étudiés afin d'essayer de comprendre les mécanismes permettant de se protéger de l'infection ou d'évoluer vers la maladie. Ces mécanismes peuvent impliquer des facteurs génétiques, virologiques, ou encore immunologiques qui peuvent interagir.

Chez les HESN, l'homozygotie pour la délétion d'une région de 32 paires de bases du gène codant pour le corécepteur CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32) empêchant l'infection des cellules par le VIH-1 a été identifiée (Samson et al., 1996). Au sein des HESN, des réponses innées et adaptatives (anticorps, T CD4<sup>+</sup> et

CD8<sup>+</sup>) spécifiques du VIH-1 ont été retrouvées (Miyazawa et al., 2009). De plus, l'activité NK des HESN a été identifiée comme un corrélant de résistance à l'infection par le VIH-1 (Tomescu et al., 2011). Enfin, il a été montré que la résistance à l'infection par le VIH-1 au niveau du tractus génital féminin était certainement associée à la capacité de l'hôte à générer une forte réponse innée et spécifique du virus tout en maintenant de faibles niveaux d'inflammation et une quantité de cellules cibles limitée (Poudrier et al., 2012).

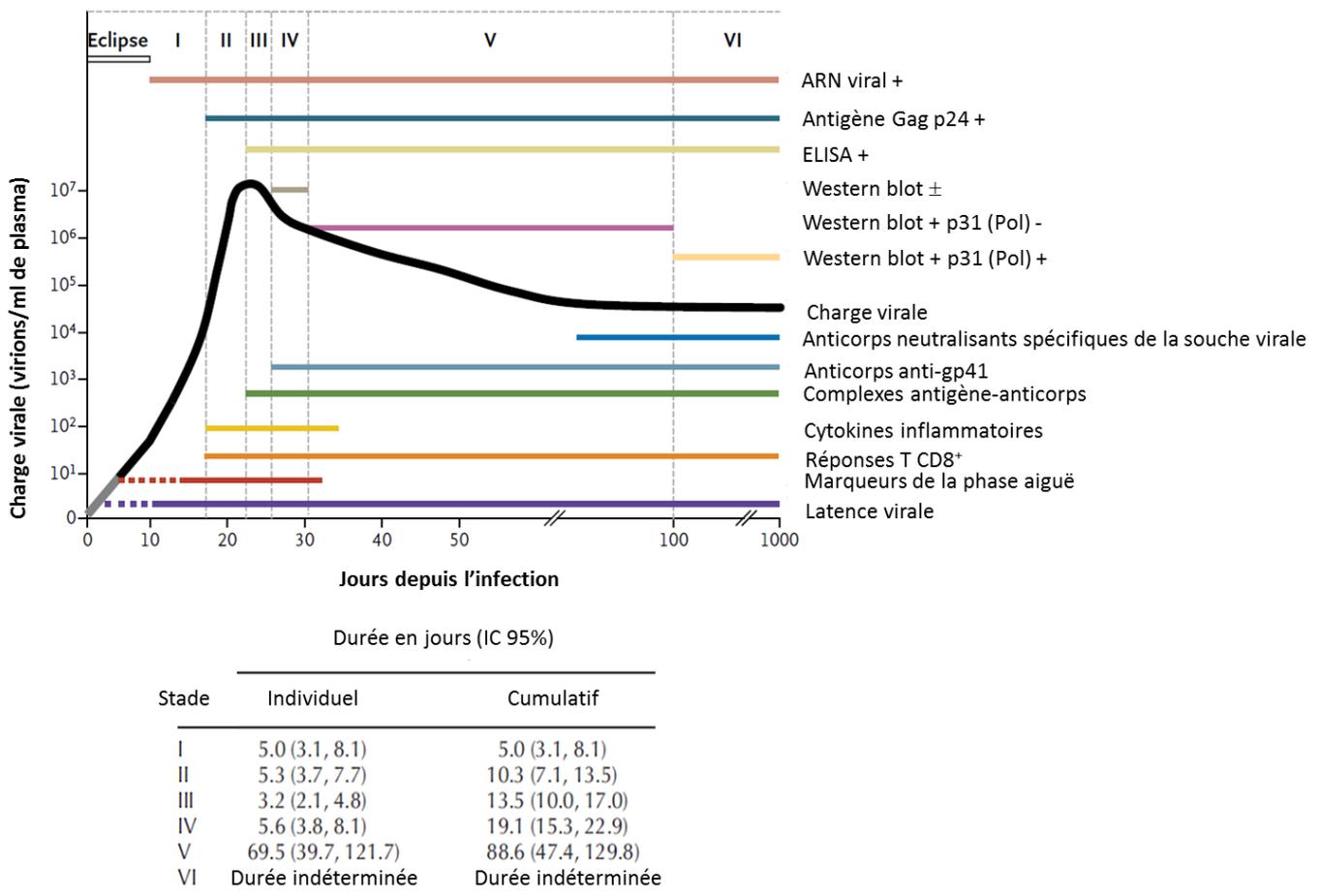
Chez les RP, des virus ayant des mutations les rendant particulièrement virulents ont été identifiés (Mori et al., 2015).

Chez les LTNP et les EC, l'hétérozygotie pour la délétion CCR5 $\Delta$ 32 a été identifiée (Dean et al., 1996). De plus, un polymorphisme dans les gènes CCR2 (autre corécepteur mineur pour le VIH-1) et SDF-1 (ligand du corécepteur CXCR4) a également été associé à une progression retardée vers la maladie (Smith et al., 1997; Winkler et al., 1998). Une association entre la présence de certains allèles des molécules HLA de classe I comme HLA B\*57 et B\*27 et le contrôle de la charge virale a notamment été observée (Carrington and O'Brien, 2003). La présence de virus faiblement répliquatifs a également été mise en évidence (Casado et al., 2018; Deacon et al., 1995; Miura et al., 2010). Enfin récemment, il a été observé que les EC avaient un faible niveau d'inflammation dans le sang associé à de fortes réponses immunitaires (Hocini et al., 2019). Les réponses immunitaires des patients LTNP et EC seront détaillées dans le paragraphe suivant.

## **II. Réponses immunitaires anti-VIH-1**

Les réponses immunitaires anti-VIH-1 sont étudiées dans différentes cohortes de patients infectés par le VIH-1, traités ou non par thérapie antirétrovirale, dont les RP, les LTNP et les EC. Ces réponses sont également étudiées chez les HESN ainsi que les individus participant à des essais vaccinaux prophylactiques ou thérapeutiques anti-VIH-1 (cela sera l'objet de la troisième partie de cette introduction). De plus, plusieurs avancées majeures dans la compréhension de ces réponses ont été possibles grâce à l'utilisation de modèles de primates non humains infectés par le VIS. En effet, l'infection de macaques par le VIS conduit à une maladie très similaire au SIDA chez l'homme. Plusieurs souches différentes de VIS sont utilisées pour l'infection des singes et un virus chimérique comprenant le gène de l'enveloppe du VIH et les autres gènes du VIS (SHIV) a également été construit afin de mimer l'infection humaine.

De manière intéressante, à l'aide de différents tests de laboratoire, l'étude de la réponse immunitaire anti-VIH dans les phases précoces de l'infection a permis de classifier la primo-infection en différentes phases. Il s'agit de la classification de Fiebig (Fiebig et al., 2003) (Figure 31). Cette classification permet de faciliter le diagnostic d'une infection récente et la stratification de patients dans des essais cliniques, afin de pouvoir étudier dans le détail les réponses immunitaires anti-VIH-1 en phase aiguë de l'infection (Cohen et al., 2011).



**Figure 31 : Stades de la primo-infection selon la classification de Fiebig**

Modifié d'après Fiebig et al., 2003 et Cohen et al., 2011. IC, intervalle de confiance.

### 1. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée anti-VIH-1 est caractérisée par un orage cytokinique détecté avant le pic de répliation virale (Stacey et al., 2009), et qui est certainement en partie responsable des conséquences immunopathologiques discutées précédemment. Nous allons maintenant nous attarder sur le rôle des cellules impliquées dans l'immunité innée anti-VIH-1.

### ***i. Les CPA***

Les neutrophiles, qui sont déplétés par apoptose chez les patients infectés par le VIH-1, sont impliqués dans les réponses innées anti-VIH-1 mais peuvent également transmettre le virus aux LT CD4<sup>+</sup> (Yaseen et al., 2017).

Les monocytes/macrophages vont s'activer suite à la translocation bactérienne et vont sécréter le soluble CD14 mais également des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF) (Sandler and Douek, 2012). Ces cellules, qui sont impliquées dans la réponse innée mais également dans l'induction de la réponse adaptative anti-VIH-1 vont également être infectées et transmettre le virus aux LT CD4<sup>+</sup>.

Le rôle des DC dans l'infection par le VIH-1 est paradoxal : ces cellules vont permettre l'induction de la réponse adaptative anti-VIH-1 mais en même temps elles vont permettre l'infection des LT CD4<sup>+</sup>.

Il a été montré par exemple que les DC pouvaient capter le VIH-1 via la molécule DC-SIGN et le transmettre aux LT CD4<sup>+</sup> activés exprimant particulièrement CCR5 dans les organes lymphoïdes secondaires (Geijtenbeek et al., 2000). De plus, même si la réplication du VIH-1 est moins productive dans les DC que dans les LT CD4<sup>+</sup>, les différents types de DC peuvent être infectés par le VIH-1 (Wu and KewalRamani, 2006). D'une manière générale, les DC provenant de patients infectés par le VIH sont moins efficaces que ceux provenant de volontaires sains pour activer les LT. Il a été montré *in vitro* que la maturation des DC de patients infectés par le VIH-1 était bloquée, perturbant ainsi la présentation antigénique et induisant la sécrétion de la cytokine régulatrice IL-10 (Granelli-Piperno et al., 2004). Il a également été montré que le VIH-1 perturbait la génération des réponses adaptatives en diminuant l'autophagie dans les DC (Blanchet et al., 2010). De plus, il a été observé une augmentation de l'expression de la molécule PD-L1 (B7-H1) à la surface des mDC de patients infectés par le VIH-1 progressant vers le stade SIDA (Wang et al., 2008), cette hausse d'expression de PD-L1 étant induite par la protéine Tat (Planes et al., 2014).

Sachant que la sécrétion d'IFN de type I par les pDC est une caractéristique générale de la réponse innée antivirale, démontrée *in vitro* dans le cas de l'infection par le VIH-1 (Fonteneau et al., 2004), il est important de noter que les virus transmis par voie muqueuse et responsables de l'infection (« transmitted/founder virus », T/F) ont la particularité d'être résistant aux IFN de type I (Iyer et al., 2017).

### ***ii. Les NK***

Comme nous l'avons vu précédemment, les NK sont des cellules de l'immunité innée ayant également des caractéristiques de l'immunité adaptative. Ces cellules ont un rôle important tant

dans la réponse innée que dans la réponse adaptative anti-VIH-1. En effet, ces cellules sécrètent des cytokines ainsi que des chimiokines et lysent les cellules infectées par le virus. Ces deux activités sont augmentées en présence d'anticorps non-neutralisants spécifiques du VIH-1 car les NK expriment à leur surface le récepteur FcγRIIIA (CD16) qui se lie au fragment constant des IgG, permettant notamment l'ADCC.

Chez les HESN, l'association génotypique et fonctionnelle entre l'augmentation de l'activité NK et la résistance à l'infection par le VIH-1 a été démontrée dans plusieurs études (Tomescu et al., 2011).

Concernant la phase aiguë de l'infection par le VIH-1, il a été montré que des NK exprimant NKG2C et ayant un phénotype « mémoire » participaient au contrôle de la charge virale (Gondois-Rey et al., 2017).

Lors de la phase chronique de l'infection par le VIH-1, plusieurs observations ont été faites. Tout d'abord il a été montré que les NK avaient la capacité de sécréter les chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES permettant d'inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* (Oliva et al., 1998). Dans le modèle macaque infecté par VIS, il a été montré que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  sécrétés par des NK spécifiques de la protéine Gag étaient associés au contrôle de la progression de la maladie (Vargas-Inchaustegui et al., 2012). De manière intéressante, il a également été montré chez des patients infectés par le VIH-1 en phase chronique que l'étendue des réponses ADCC médiées par les NK IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> était associée au statut de LTNP (Wren et al., 2013) ou encore que la présence de NK CD8<sup>+</sup> polyfonctionnels était associée à une progression plus lente vers la maladie (Ahmad et al., 2014). Enfin, des études de génétique effectuées sur différentes populations ont montré un rôle des NK exprimant les récepteurs KIR dans le contrôle de la réplication virale et la progression dans la maladie (Jost and Altfeld, 2013).

Cependant, l'activité antivirale des cellules NK est limitée par la sélection de polymorphismes de séquences du VIH-1 favorisant la liaison à des récepteurs KIR inhibiteurs (Alter et al., 2011). De plus, il a été montré que l'infection par le VIH-1 entraînait une dérégulation des sous-populations de NK se traduisant par l'apparition de sous-populations à l'activité fonctionnelle (mesurée par le marqueur de dégranulation CD107a) réduite (Alter et al., 2005).

### ***iii. Les autres cellules de l'immunité innée***

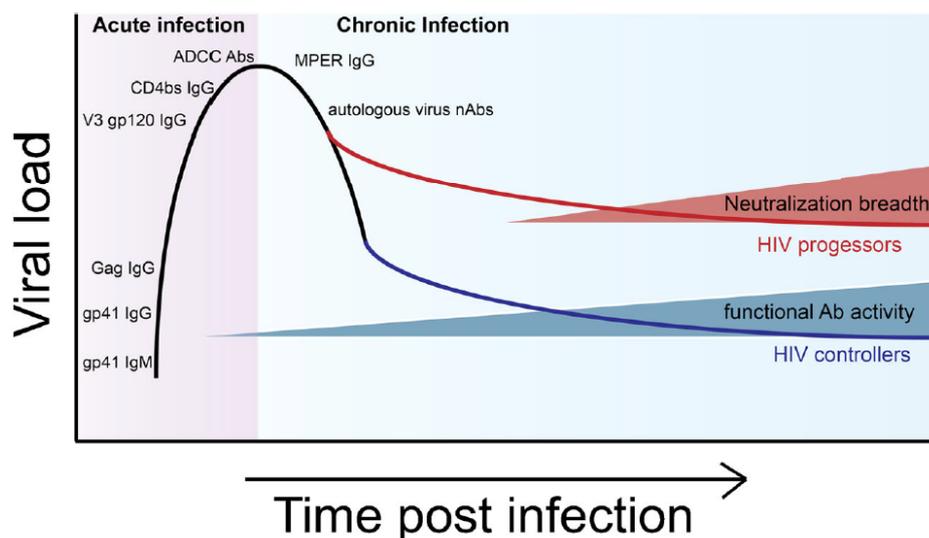
Parmi les autres cellules impliquées dans l'immunité innée, les NKT sont généralement déplétées au cours de l'année suivant l'infection par le VIH-1 (van der Vliet et al., 2002).

## 2. La réponse immunitaire adaptative

### i. La réponse humorale

#### a. Cinétique d'apparition des anticorps

Les premières réponses humorales dirigées contre le VIH-1 apparaissent dans les 2 premières semaines de l'infection, tout d'abord sous forme d'immuns complexes puis sous la forme d'IgM et d'IgG dirigées contre la protéine gp41 du virus (Tomaras et al., 2008) (**Figure 32**). Il semblerait que les IgG anti-gp41 proviennent du recrutement de LB mémoires spécifiques d'antigènes du microbiome intestinal qui cross-réagissent avec des antigènes de la gp41 du VIH-1 (Trama et al., 2014). Toutefois, ces premières réponses anticorps ne semblent pas avoir d'effet sur le contrôle de la charge virale au cours de la primo-infection (Tomaras et al., 2008). Viendront ensuite les anticorps dirigés contre les protéines p24 et p55 de Gag, utilisés pour le diagnostic de l'infection, après 3 semaines d'infection. Les premiers anticorps dirigés contre la protéine gp120 n'apparaîtront quant à eux qu'après 28 jours d'infection en moyenne, d'abord sous forme d'anticorps spécifiques dirigés contre la boucle hypervariable V3, puis contre le site de liaison au CD4. Bien que plus rares, des anticorps dirigés contre la région MPER « membrane-proximal external region » de la gp41 peuvent également apparaître plus tardivement après 5 à 10 semaines d'infection (Butler et al., 2019). Même si les anticorps sécrétés en primo-infection ne sont pas neutralisants, ils contribuent à l'activité antivirale en induisant des fonctions effectrices des cellules de l'immunité innée, comme l'ADCC médiée par les NK (Forthal et al., 2001).



**Figure 32 : Chronologie de l'immunité humorale anti-VIH-1**

D'après Butler et al., 2019.

*b. Les anticorps neutralisants*

Les anticorps neutralisants spécifiques de la souche de VIH-1 autologue infectant l'individu apparaissent plusieurs mois après l'infection (Gray et al., 2007), marquant la transition en phase chronique. Le virus mute rapidement en réponse à la pression immunitaire exercée par ces anticorps neutralisants et en retour, de nouveaux anticorps neutralisants sont générés par l'individu vis-à-vis de la nouvelle souche autologue (Richman et al., 2003). Ce cercle vicieux, où le virus a toujours « un coup d'avance » sur la réponse immunitaire humorale, continue pendant toute la phase chronique de l'infection. Même si une réponse anticorps neutralisante spécifique du VIH-1 se développe chez le sujet infecté, elle n'est pas optimale, et cela pour plusieurs raisons :

- La faible densité de complexes trimériques de glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 (Zhu et al., 2006), et surtout leur espacement ne permet pas aux IgG de pouvoir fixer leurs deux Fab sur des épitopes simultanément, réduisant ainsi l'avidité des anticorps dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 et les rendant plus vulnérables aux mutations du virus diminuant l'affinité de la liaison épitope-paratope (Klein and Bjorkman, 2010),

- La faible densité de complexes trimériques de glycoprotéines de l'enveloppe combinée au fait que l'enveloppe du VIH-1 provient de la membrane plasmique de sa cellule hôte va possiblement favoriser l'induction d'anticorps auto-réactifs qui seront éliminés mais vont freiner l'induction d'une réponse anticorps dirigée contre l'enveloppe du VIH-1 (Haynes et al., 2005; Schiller and Chackerian, 2014),

- La gp120 est une protéine extrêmement glycosylée, ce qui va empêcher les anticorps d'accéder aux sites antigéniques de cette protéine (Back et al., 1994; Wei et al., 2003),

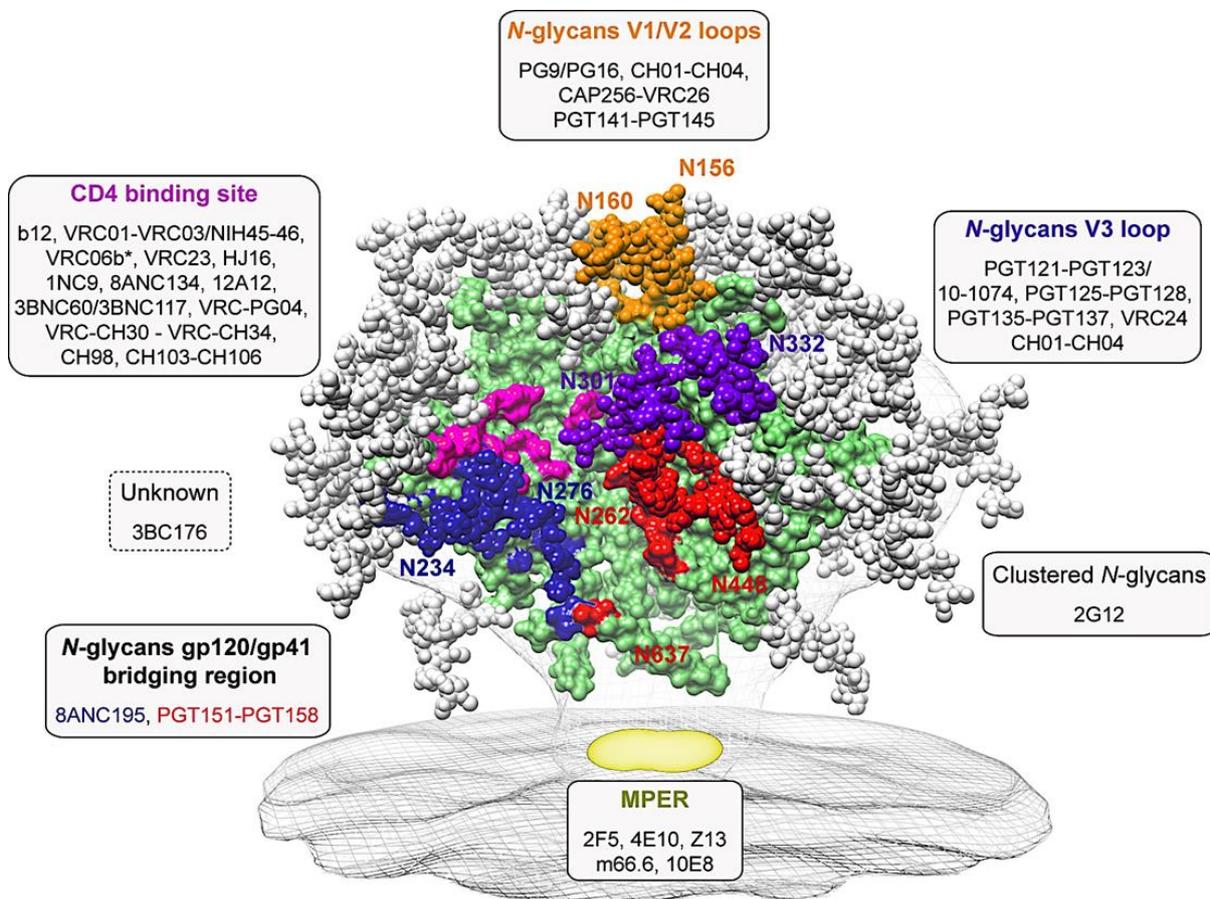
- Les épitopes de la gp120 situés au niveau des sites de liaison aux récepteurs sont naturellement masqués par la conformation du complexe trimérique de la glycoprotéine de l'enveloppe (Kwong et al., 2002),

- L'activation immunitaire chronique induite par l'infection ainsi que la réplication continue du VIH-1 entraînent la destruction de l'architecture des ganglions lymphatiques et une dysfonction des LB (Moir and Fauci, 2009). De manière intéressante, il a été montré que l'initiation du traitement antirétroviral pendant la phase aiguë de l'infection permettait de préserver la fonctionnalité des TFH et des LB spécifiques du VIH-1 au niveau de la muqueuse intestinale (Planchais et al., 2018).

Après plusieurs années d'infection, environ 30% des individus arrivent tout de même à générer des anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs) vis-à-vis de certaines souches hétérologues (Butler et al., 2019). Cependant, les bNAbs capables de neutraliser la majorité des souches provenant de différents sous-types du VIH-1 du groupe M, n'apparaissent eux que chez 1% des patients infectés par le VIH-1. Ces patients sont appelés « elite neutralizers » (Simek et al., 2009). Les bNAbs ont la

particularité de posséder de nombreuses mutations somatiques, un long CDR3 sur la chaîne lourde, et une auto-réactivité importante (Mascola and Haynes, 2013). La présence de bNAbs a été corrélée à la quantité d'ARN viral circulant (Sajadi et al., 2011), démontrant ainsi que le VIH-1 arrive à contourner efficacement l'immunité humorale mise en place par l'individu.

Si la présence de bNAbs ne semble pas avantageuse dans le contrôle de la maladie chez des patients infectés par le VIH-1, l'induction de ce type d'anticorps est recherchée en vaccination prophylactique. En effet, un vaccin capable d'induire des bNAbs pourrait certainement protéger la population d'une infection par le VIH-1. De ce fait, la recherche concernant ces anticorps est très active et de nombreux bNAbs ciblant différentes régions de la protéine d'enveloppe du VIH-1 ont maintenant été isolés et caractérisés (Mouquet, 2014) (Figure 33).



**Figure 33 : Sites de vulnérabilité de l'enveloppe du VIH-1 ciblés par les principaux bNAbs identifiés**

D'après Mouquet, 2014.

*c. Les anticorps non-neutralisants*

Dès 1987, l'activité ADCC a été observée chez des patients infectés par le VIH-1 (Rook et al., 1987). Il y a maintenant plus de 20 ans, il a été montré que l'activité ADCC anti-gp120 était inversement corrélée avec la progression vers le stade SIDA chez des patients infectés par le VIH-1 (Baum et al., 1996). Contrairement aux bNAbs, dont l'activité n'est pas retrouvée de manière importante chez les EC (Doria-Rose et al., 2009), la présence d'anticorps non-neutralisants associés à une forte réponse ADCC a été observée pendant la phase chronique de l'infection chez les EC (Kulkarni et al., 2017; Lambotte et al., 2013; Madhavi et al., 2017). Il faut savoir que l'ADCC n'est pas la seule fonction effectrice de l'immunité innée induite de manière importante chez les EC. En effet, contrairement aux progressseurs, les EC sont capables de générer des anticorps polyfonctionnels doués de fonctions ADCC, ADCP et ADCD (Ackerman et al., 2016). De manière intéressante, il a été montré que la glycosylation des anticorps spécifiques du VIH-1 était biaisée chez les EC de manière à augmenter la fonction effectrice de ces anticorps (Ackerman et al., 2013). En outre, il a récemment été montré que certains bNAbs pouvaient également avoir une activité ADCC (Bruehl et al., 2016).

D'autres protéines que l'enveloppe du VIH-1 peuvent être la cible d'anticorps ayant des fonctions médiées par leur fragment Fc. Ainsi l'activité ADCC anti-Vpu a été inversement corrélée avec la progression de la maladie (Wren et al., 2013). Il a également été montré récemment que la présence d'anticorps IgG1 dirigés contre la protéine Gag p24 du VIH-1 ayant des fonctions ADCC et ADCP était associée à un contrôle de la charge virale en phase chronique de l'infection (Chung et al., 2018). L'induction de ce type d'anticorps, en plus de ceux générant une activité neutralisante à large spectre, est donc fortement souhaitable pour un vaccin contre le VIH-1.

*d. Les IgA*

Le rôle des IgA, qui sont retrouvés dans le sérum principalement sous forme monomérique et au niveau des muqueuses essentiellement sous forme dimérique, est difficile à évaluer dans l'infection par le VIH-1 (Lopez et al., 2018). Malgré une augmentation rapide du niveau des IgA totales dans le sérum après l'infection par le VIH-1, la réponse IgA spécifique du VIH-1 est faible comparativement à la réponse IgG. Cependant, des IgA spécifiques du site de liaison au CD4 capables de neutraliser des souches de différents sous-types du VIH-1 ont été retrouvées dans le plasma de LTNP (Planque et al., 2010). Chez les HESN, la présence d'IgA au niveau muqueux et/ou systémique a été observée dans certaines études mais pas dans d'autres (Miyazawa et al., 2009; Tomescu et al., 2011). La présence d'IgA spécifiques du VIH-1 au niveau muqueux pourrait alors représenter un corrélât d'exposition plutôt qu'un mécanisme de protection (Lopez et al., 2018).

## ***ii. La réponse T CD4<sup>+</sup>***

### ***a. Réponse proliférative et cytokinique pendant la primo-infection***

Le fait que les LT CD4<sup>+</sup> soient la cible du VIH-1 empêche de manière générale l'induction d'une forte réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique du virus pendant la primo-infection (Musey et al., 1999) et donc plus généralement d'une réponse adaptative optimale, d'autant plus que les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 ont été identifiés comme une cible préférentielle du VIH-1 (Douek et al., 2002). Ainsi il a été montré que les patients virémiques perdaient leurs LT<sub>CM</sub> produisant exclusivement de l'IL-2 et que leur LT<sub>EM</sub> sécrétant normalement de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2 ne produisaient plus l'IL-2, probablement en conséquence à la réplication persistante du VIH-1 (Younes et al., 2003). Cependant, il a été montré que l'induction de réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques de Gag lors de la primo-infection était associée à un meilleur contrôle de la réplication virale (Gloster et al., 2004; Schieffer et al., 2014).

### ***b. Réponse proliférative et cytokinique pendant la phase chronique***

En phase chronique, des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de la protéine Gag du VIH-1 et sécrétant de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$ , de l'IL-2 mais pas d'IL-4 ni d'IL-13 sont détectés chez les patients infectés par le VIH-1 (Pitcher et al., 1999). Cependant, la perte de la capacité à sécréter de l'IL-2 par les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de la protéine Gag p24 du VIH-1 a été corrélée avec la charge virale plasmatique (Harari et al., 2004), cette détérioration fonctionnelle étant associée à l'expression des « immune checkpoint » PD1 (D'Souza et al., 2007) et CTLA-4 (Kaufmann et al., 2007) sur les LT CD4<sup>+</sup>. La perte de cette capacité à sécréter de l'IL-2 est très importante car cette cytokine est associée aux capacités prolifératives des LT. Il a notamment été montré que la perte de la capacité des LT CD4<sup>+</sup> à sécréter de l'IL-2 était responsable des défauts fonctionnels des LT CD8<sup>+</sup> lors de la phase chronique de l'infection (Lichterfeld et al., 2004). Il a également été montré dans le modèle macaque infecté par VIS, que l'IL-2 sécrétée par des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de la protéine Gag permettait l'activation de NK sécrétant de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  associés au contrôle de la progression de la maladie (Vargas-Inchaustegui et al., 2012). De manière intéressante, il a également été montré que les TFH, qui sont massivement infectés par le VIH-1 dans les ganglions lymphatiques (Perreau et al., 2013), étaient incapables d'apporter l'aide nécessaire aux LB dans les centres germinatifs, pouvant ainsi contribuer à la relative incapacité des patients infectés par le VIH-1 à générer des anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs) (Cubas et al., 2013).

Néanmoins, dès 1994, la présence de réponses prolifératives dirigées contre la protéine Gag p24 du VIH-1 a été associée à une absence de la baisse du nombre de cellules CD4<sup>+</sup> circulantes chez des patients infectés par le VIH-1 en phase asymptomatique (Pontesilli et al., 1994). De plus, il a été observé il y a maintenant plus de 20 ans que la présence de fortes réponses prolifératives T CD4<sup>+</sup> dirigées contre la protéine Gag p24 était associée à un contrôle de la charge virale chez des patients infectés par le VIH-1 (Rosenberg et al., 1997). En outre, il a été montré dans des cohortes de LTNP que la présence et la persistance de ces réponses était prédictive du maintien du statut de non-progressateur (Dyer et al., 2008; Pontesilli et al., 1999). Alors que l'étendue et l'intensité des réponses T CD4<sup>+</sup> dirigées contre Gag sont associées à des niveaux plus faibles de virémie, le contraire est observé concernant les réponses dirigées contre la protéine Env (Ranasinghe et al., 2012). Cependant, Gag n'est pas la seule protéine du VIH-1 ciblée par les LT CD4<sup>+</sup> et importante pour le contrôle de la réplication virale. En effet, des réponses T CD4<sup>+</sup> prolifératives et cytokiniques (sécrétion d'IFN $\gamma$ ) spécifiques de la protéine Nef du VIH-1 ont également été associées à la non progression de l'infection (Pancré et al., 2007).

Si l'intensité et l'étendue des réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 sont des caractéristiques importantes, la qualité de ces réponses l'est tout autant. Cela a été prouvé en observant les réponses T CD4<sup>+</sup> retrouvées chez les patients EC. En effet, il a été montré que ces patients préservaient leur population T<sub>CM</sub> et possédaient des T<sub>EM</sub> capables de sécréter de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2 (Potter et al., 2007). Chez ces patients, la présence de LT CD4<sup>+</sup> capables de produire de l'IL-21, cytokine potentiellement impliquée dans le maintien des capacités fonctionnelles des LT CD8<sup>+</sup> dans les infections chroniques (Elsaesser et al., 2009), a également été observée (Chevalier et al., 2010). De plus, il a été montré que certains EC possédaient des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de Gag présentant un TCR ayant une forte avidité vis-à-vis de certains complexes CMH/peptide, leur permettant ainsi de maintenir une réponse T CD4<sup>+</sup> efficace même en présence d'une faible charge virale (Vingert et al., 2010). En effet, ces clonotypes de TCR (séquences nucléotidiques uniques générées durant le processus de réarrangement des gènes de ce récepteur) confèrent une restriction par différentes molécules HLA de classe II, une haute sensibilité à l'antigène, et une polyfonctionnalité (c'est-à-dire ayant une capacité à sécréter de multiples cytokines et chimiokines) aux LT CD4<sup>+</sup>, leur permettant certainement ainsi de générer une réponse efficace (Benati et al., 2016).

*c. Réponse proliférative et cytokinique sous ART*

Les premières études des réponses T CD4<sup>+</sup> sous ART ont été réalisées après une mise sous traitement des patients en phase chronique de l'infection. Il a alors été montré une diminution de ces réponses par rapport aux patients non traités (Pitcher et al., 1999). De manière intéressante, il a tout de même été observé qu'après une longue période sous ART (10 ans), des patients ayant commencé leur traitement antirétroviral en phase chronique pouvait présenter des réponses prolifératives comparables à celles de patients EC (Guihot et al., 2010). Par contre, l'intérêt de l'initiation du traitement antirétroviral pendant la primo-infection a clairement été démontré par l'observation d'une fréquence plus importante de réponses T CD4<sup>+</sup> prolifératives vis-à-vis de la protéine Gag p24 comparée à un traitement initié en phase chronique (Lacabaratz-Porret et al., 2004). Une étude récente a également montré qu'après environ 1 mois de traitement antirétroviral initié pendant la phase hyper-aiguë de l'infection (stades Fiebig I-II = 10 à 22 jours après le début de l'infection) des fréquences importantes de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 sécrétant de l'IFN $\gamma$  pouvaient être détectées (Ndhlovu et al., 2019). Enfin, l'étude de la cohorte VISCONTI ou contrôleurs après traitement (« post-treatment controllers », PTC), composée de patients infectés par le VIH-1 ayant initié un traitement antirétroviral dans les 10 semaines suivant l'infection, l'ayant suivi pendant une durée d'environ 3 ans avant de l'arrêter pendant plus de 7 ans tout en contrôlant leur charge virale (Sáez-Cirión et al., 2013), a montré que ces patients avaient une fréquence de réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 similaire à celle de LTNP ou de patients sous traitement antirétroviral initié en primo-infection (Samri et al., 2016).

*d. Réponse cytotoxique*

La présence de LT CD4<sup>+</sup> cytotoxiques a été observée chez des patients infectés par le VIH-1 en phase aiguë et chronique de l'infection (Appay et al., 2002b; Nemes et al., 2010). Il a été montré que la présence de ces cellules participait au contrôle de la virémie en primo-infection (Johnson et al., 2015). De plus, il a été montré que l'expansion de LT CD4<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques de la protéine Gag et produisant de l'IFN $\gamma$  et du Granzyme A lors la phase aiguë de l'infection par le VIH-1 était associée à une progression plus lente de la maladie (Soghoian et al., 2012). De manière intéressante, des LT CD4<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques d'un épitope de la protéine Nef capables d'inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* ont été détectés chez plusieurs patients en phase chronique de l'infection (Zheng et al., 2009). Récemment, il a également été montré *in vitro* que les clonotypes de TCR de haute affinité présents chez les EC conféraient un potentiel cytotoxique aux LT CD4<sup>+</sup>, leur permettant ainsi d'inhiber la réplication du VIH-1 (Galperin et al., 2018).

e. Réponse chimiokinique

Enfin, il n'est pas exclu que les chimiokines sécrétées LT CD4<sup>+</sup> spécifiques ou non du VIH-1 aient également un rôle dans le contrôle de la réplication virale du VIH-1 *in vivo*. En effet, des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 sécrétant les chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES, ligands du corécepteur CCR5 et donc susceptibles d'empêcher l'infection par les souches R5 du VIH-1, ont été retrouvés chez des HESN (Furci et al., 1997). De même, il a été observé *in vitro* que des LT CD4<sup>+</sup> provenant de LTNP mais pas de patients au stade SIDA étaient capables de produire ces cytokines (Saha et al., 1998). Dans un modèle *in vitro* mimant une réponse primaire, il a également été montré que des LT CD4<sup>+</sup> pouvaient sécréter la chimiokine MDC (« macrophage-derived cytokine » ou CCL22), ligand du corécepteur CXCR4 du VIH-1, en plus des chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES (Abdelwahab et al., 2003). Dans ces différentes études, les chimiokines sécrétées étaient capables d'inhiber *in vitro* une infection par des souches R5 (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES) ou X4 (MDC) du VIH-1.

Malgré le fait que les LT CD4<sup>+</sup> soient la cible du VIH-1 et des CTL, des réponses T CD4<sup>+</sup> sont générées par les patients infectés par le VIH-1, et particulièrement chez les LTNP et les EC. Ces réponses semblent importantes dans le contrôle du virus (Tableau 2). Par ailleurs, il faut également noter qu'une association entre certaines molécules HLA de classe II et le niveau de réplication du VIH-1 a été observée (Ranasinghe et al., 2013). Enfin, des réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 ont également été retrouvées chez des HESN (Miyazawa et al., 2009; Tomescu et al., 2011). Dans la quête d'un vaccin contre le VIH-1, l'ensemble de ces données concourent à penser qu'un vaccin efficace devra permettre l'induction de telles réponses.

Corrélat	Auteurs
LT CD4 <sup>+</sup> ciblant la protéine Gag	Gloster et al., 2004 ; Schieffer et al., 2014 ; Rosenberg et al., 1997 ; Pontesilli et al., 1999 ; Dyer et al., 2008
LT CD4 <sup>+</sup> ciblant la protéine Nef	Panqué et al., 2007
LT <sub>CM</sub> et LT <sub>EM</sub> sécrétant IFN $\gamma$ et IL-2	Potter et al., 2007
LT CD4 <sup>+</sup> ayant un TCR de forte avidité	Vingert et al., 2010
LT CD4 <sup>+</sup> ayant une fonction cytotoxique	Johnson et al., 2015 ; Soghoian et al., 2012 ; Zheng et al., 2009
LT CD4 <sup>+</sup> sécrétant des chimiokines	Saha et al., 1998

**Tableau 2 : Principaux corrélats de contrôle de la réplication virale par les LT CD4<sup>+</sup> anti-VIH-1**

### ***iii. La réponse T CD8<sup>+</sup>***

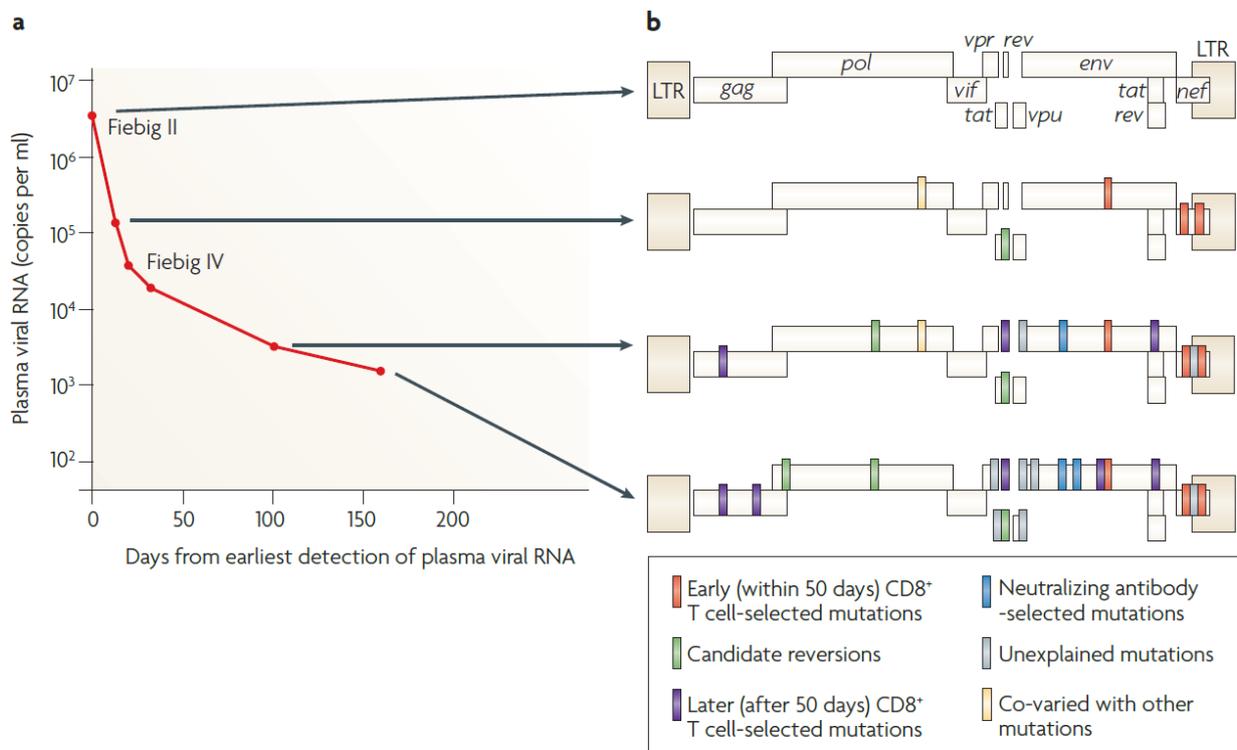
#### ***a. Importance démontrée dans le modèle macaque***

La démonstration de l'implication des LT CD8<sup>+</sup> dans le contrôle de la charge virale a été réalisée par des expériences de déplétion de cette population cellulaire dans le modèle macaque. La première expérience de ce type a été réalisée en primo-infection, après une infection intraveineuse par un SHIV (Matano et al., 1998). Après administration d'un anticorps monoclonal anti-CD8, une déplétion transitoire des LT CD8<sup>+</sup> est observée aussi bien dans le sang périphérique que les tissus lymphoïdes. Dans le même temps, les niveaux de charge virale plasmatique (ARN) et de virus associé aux cellules (ADN) augmentent dans le sang périphérique et les tissus lymphoïdes, entraînant une baisse du taux de LT CD8<sup>+</sup>. L'année suivante, deux autres études de déplétions de LT CD8<sup>+</sup> réalisées en phase aiguë ou en phase chronique d'une infection VIS par voie intraveineuse ou muqueuse chez le macaque sont publiées, montrant également une hausse de la charge virale plasmatique concomitante à la déplétion des LT CD8<sup>+</sup> (Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999). Ces différentes expériences ont été déterminantes pour démontrer le rôle clé des LT CD8<sup>+</sup> dans le contrôle de l'infection par un VIS, qui a été extrapolé pour l'infection par le VIH chez l'homme. Il a également été récemment démontré dans le modèle macaque que même sous traitement antirétroviral, les LT CD8<sup>+</sup> contrôlent l'infection par VIS (Cao et al., 2018; Cartwright et al., 2016).

#### ***b. Réponse cytotoxique lors de la primo-infection***

Les réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 sont généralement détectées dans le sang une à deux semaines après le pic de virémie et coïncident avec la diminution de la charge virale (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994; Wilson et al., 2000). Au sein d'une cohorte de femmes à haut risque d'infection, il a été montré que lors de la phase hyper-aiguë de l'infection, l'apparition de la charge virale plasmatique entraînait une activation massive, une prolifération, puis une apoptose des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 dont l'intensité et la cinétique impactait le « viral setpoint » (Ndhlovu et al., 2015). L'importance de la diversité des réponses CTL en primo-infection a été révélée par une étude de la variabilité des TCR des CTL spécifiques du VIH-1 qui a montré que des individus générant des réponses oligoclonales évoluaient plus facilement en phase SIDA que ceux générant des réponses polyclonales (Pantaleo et al., 1997). Une autre preuve de l'importance de la diversité des réponses CTL en primo-infection a été apportée par la présence de mutations spécifiques du VIH-1 au niveau d'épitopes reconnus par les LT CD8<sup>+</sup>, permettant ainsi au virus d'échapper à la réponse CTL (Borrow et al., 1997; Price et al., 1997). Ce même mécanisme d'échappement à la réponse CTL a également été observé dans le modèle macaque en phase aiguë de l'infection par un VIS (Allen et al., 2000). Cet

échappement est possible par au moins 3 mécanismes : une mutation au niveau d'un acide aminé d'ancrage de l'épitope pouvant empêcher sa fixation avec la molécule du CMH (Couillin et al., 1994), ou une mutation au niveau d'un acide aminé en contact avec le TCR pouvant soit inhiber la liaison TCR/peptide (Lill et al., 1992), soit rendre le LT anergique (Klenerman et al., 1994). Des études détaillées des mutations retrouvées chez des patients suivis plusieurs années depuis leur primo-infection ont permis de démontrer que toutes les protéines du VIH-1 étaient la cible de CTL et subissaient des mutations permettant un échappement de la réponse CTL (Allen et al., 2005; Liu et al., 2006). Cependant, il a été démontré que les réponses CTL contribuaient au contrôle de la réplication virale pendant la primo-infection car même si le virus mute, de nouvelles réponses dirigées contre des épitopes plus conservés émergent, permettant ainsi l'établissement du « viral setpoint » (Goonetilleke et al., 2009; McMichael et al., 2010) (Figure 34).



**Figure 34 : Cinétique des mutations d'échappement viral aux réponses T CD8<sup>+</sup> lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1**

D'après McMichael et al., 2010. Evolution de la charge virale plasmatique (a) et des changements d'acides aminés au sein des protéines du VIH-1 (b) en fonction des phases de la classification Fiebig de la primo-infection.

Même si l'intensité ou l'étendue de la réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 n'influe pas forcément sur ce « viral setpoint », l'émergence de réponses T CD8<sup>+</sup> propres à chaque patient pendant la primo-infection peut déterminer l'évolution de la maladie à long terme (Streeck et al., 2014).

Une question primordiale est alors de savoir pourquoi le virus n'est pas éliminé durant la phase aiguë de l'infection malgré une fréquence de CTL pouvant approcher les 10% des LT CD8<sup>+</sup> totaux juste après le pic de charge virale, comme cela a été observé dans le modèle macaque (Kuroda et al., 1999). Si l'émergence de mutations peut certainement être une réponse valable, plusieurs autres hypothèses peuvent être émises :

- l'existence de cellules infectées quiescentes invisibles pour les CTL, représentant un réservoir de virus (Chun et al., 1997),
- le faible niveau de perforine dans les granules cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> présents dans les tissus lymphoïdes lors de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1 (Andersson et al., 2002),
- la diminution de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées, médiée par Nef, empêchant ainsi leur lyse par les CTL (Collins et al., 1998; Schwartz et al., 1996; Tomiyama et al., 2002),
- la susceptibilité accrue à l'apoptose des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 pendant la primo-infection (Ndhlovu et al., 2015; Trautmann et al., 2012).

### *c. Réponse cytotoxique lors de la phase chronique*

C'est chez des patients en phase chronique de l'infection que les premiers CTL spécifiques du VIH-1 ont initialement été identifiés (Hoffenbach et al., 1989; Walker et al., 1987). Ensuite, des associations ont été trouvées entre les protéines ciblées par les CTL et le contrôle de la réplication virale. En effet, il a rapidement été observé que les patients infectés par le VIH-1 en phase chronique ayant une réponse CTL ciblant la protéine Gag du VIH-1 avaient un meilleur pronostic concernant l'évolution de la maladie (Pontesilli et al., 1998; Riviere et al., 1995), alors que le contraire a été observé concernant la protéine Env (Kiepiela et al., 2007). De plus, l'intensité et l'étendue des réponses T CD8<sup>+</sup> dirigées contre Gag ont été directement corrélées avec le taux de LT CD4<sup>+</sup> et inversement corrélées avec la charge virale des patients (Edwards et al., 2002; Zuniga et al., 2006). Il a également été rapporté que certaines réponses T CD8<sup>+</sup> dirigées contre la protéine Nef, et en particulier sa partie centrale, contribuaient au contrôle de la réplication du VIH-1 (Adland et al., 2013).

Comme le virus n'est pas totalement éliminé pendant la phase aiguë de l'infection, les CTL continuent leur action pendant la phase chronique où ils sont détectables à une fréquence relativement importante (0.2% à 1% des LT totaux) dans le sang des personnes infectées (Moss et al.,

1995). Le virus et la réponse immunitaire continuent alors d'évoluer conjointement pendant cette phase chronique et il a été montré que la transition en phase SIDA pouvait être due à un échappement tardif du virus à une réponse CTL immunodominante (Goulder et al., 1997). Durant la phase chronique de l'infection, des mutations ont également été détectées non pas au sein des épitopes T CD8<sup>+</sup> mêmes, mais dans les régions flanquantes, altérant ainsi l'apprêtement de l'antigène et empêchant que l'épitope soit présenté aux CTL (Draenert et al., 2004). Ce phénomène représente donc un quatrième mécanisme conduisant à l'échappement du virus à la réponse CTL. Cependant, toutes les mutations entraînant un échappement du virus aux CTL ne sont pas forcément délétères pour les patients car certaines mutations peuvent engendrer en contrepartie une réduction de la capacité répliquative du VIH-1 (Martinez-Picado et al., 2006; Troyer et al., 2009).

La comparaison des réponses T CD8<sup>+</sup> présentes en phase aiguë et chronique de l'infection a permis de mettre en évidence que la fréquence des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 sécrétant de l'IFN $\gamma$  était plus faible en primo-infection mais que ces cellules étaient plus cytotoxiques (Trautmann et al., 2012). En effet, malgré une production de cytokines antivirales, il a été montré que les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 circulants pendant la phase chronique de l'infection présentaient un défaut de production de perforine et d'activité cytotoxique (Appay et al., 2000). Ce défaut de production de perforine des LT exprimant le CD27 suggère un défaut de maturation de ces CTL. L'activation immunitaire chronique ainsi que la stimulation antigénique persistante, caractéristiques de l'infection par le VIH-1, vont en fait entraîner une inhibition des fonctions effectrices et prolifératives des LT. Plusieurs « immune checkpoint » comme PD1 (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006) ou encore LAG3 (Tian et al., 2015) et TIM3 (Jones et al., 2008) vont alors être exprimés à la surface des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1. De manière intéressante, il a été montré dans le modèle macaque que le passage de la phase aiguë à la phase chronique de l'infection était caractérisé par une disparition de l'expression de la perforine et du granzyme B dans les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIS lié à la faible expression du facteur de transcription T-bet (Roberts et al., 2016).

De plus, à force d'être perpétuellement activées, les cellules du système immunitaire vont définitivement perdre leur capacité proliférative et présenter des signes de différenciation avancée (perte de l'expression des molécules CD27 et CD28) et de vieillissement prématuré (surexpression de la molécule CD57) (Appay and Rowland-Jones, 2002; Papagno et al., 2004). C'est le phénomène d'immuno-sénescence, caractérisé par le déclin du niveau des cellules T naïves CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> (Appay et al., 2011), signe d'épuisement des ressources immunitaires. Les LT CD8<sup>+</sup> deviennent non fonctionnels et la répllication virale incontrôlée va alors rapidement induire la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> du sang périphérique et l'entrée en stade SIDA. En effet, en phase SIDA, les LT CD8<sup>+</sup> ne sécrètent plus d'IFN $\gamma$  et ne sont plus fonctionnels (Kostense et al., 2002; Trimble and Lieberman, 1998).

Lors de la phase chronique, la quantité mais surtout la qualité des réponses T CD8<sup>+</sup> étudiées chez les patients LTNP et EC ont été mises en exergue. Tout d'abord, il a été observé que les LTNP possédaient des niveaux plus importants de CTL spécifiques des protéines Gag, Pol et Env que les patients progressifs (Rinaldo et al., 1995). Ensuite, il a été montré que les EC possédaient des LT CD8<sup>+</sup> plus polyfonctionnels que les progressifs (Betts et al., 2006). La capacité supérieure de ces LT CD8<sup>+</sup> à proliférer (Migueles et al., 2002; Ndhlovu et al., 2013), à inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* (Saez-Cirion et al., 2007) *via* l'exocytose de granules cytotoxiques contenant du granzyme B (Migueles et al., 2008), et à produire de la perforine *ex vivo* lors d'une stimulation spécifique du VIH-1 (Hersperger et al., 2010) a également été mise en évidence. En outre, le contrôle de la réplication virale chez les EC a été associé à la présence de réponses CTL de forte avidité fonctionnelle ayant une large réactivité vis-à-vis des variants les plus fréquents de la protéine Gag p24 (Mothe et al., 2012). De manière intéressante, il a été montré que cette avidité fonctionnelle ou sensibilité à l'antigène (qui est la résultante des interactions TCR-CMH/peptide, de la signalisation par les corécepteurs et de l'environnement cytokinique) était également un facteur majeur déterminant la polyfonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> (Almeida et al., 2009).

Il est maintenant clair que de fortes associations ont été trouvées entre certaines molécules HLA de classe I et le contrôle de la réplication du VIH-1, notamment pour les molécules B\*27 et B\*57. A l'inverse, la molécule B\*35 est associée à une progression rapide de la maladie. (Carrington and O'Brien, 2003). Une étude d'association pangénomique dans une cohorte multi-ethnique de contrôleurs et de progressifs pour le VIH-1 a montré que la nature de l'interaction HLA/peptide était le facteur génétique majeur modulant le contrôle de l'infection par le VIH-1 (Pereyra et al., 2010). D'ailleurs, il a tout récemment été montré que la topologie structurale (étude des acides aminés de la séquence du VIH-1 importants topologiquement au niveau des sites d'ancrage des molécules HLA, du contact avec le TCR ou encore des sites flanquant les épitopes) permettait de définir les épitopes T CD8<sup>+</sup> protecteurs du protéome du VIH-1 (Gaiha et al., 2019). De plus, il a été montré que les clonotypes des TCR sélectionnés durant l'infection naturelle modulaient l'effet protecteur des molécules HLA de classe I dans l'infection par le VIH-1 (Chen et al., 2012; Iglesias et al., 2011; Ladell et al., 2013). Cependant, le lien entre la sensibilité à l'antigène, l'avidité du TCR et la capacité suppressive de la réplication du VIH-1 des LT CD8<sup>+</sup> dépend de la restriction HLA, de l'épitope ciblé ainsi que de la souche de virus (Lissina et al., 2014). Enfin, il a également été montré chez des LTNP que les réponses T CD8<sup>+</sup> restreintes par les molécules HLA « protectrices » (associées au contrôle de la réplication virale) n'étaient pas réprimées par les Treg, contrairement aux réponses T CD8<sup>+</sup> restreintes par d'autres molécules HLA « non protectrices » chez ces mêmes patients (Elahi et al., 2011).

De manière intéressante, l'existence de LT CD8<sup>+</sup> restreints par des molécules HLA de classe II et spécifiques du VIH-1 a récemment été montrée chez quelques patients EC (Nyanhete et al., 2019; Ranasinghe et al., 2016), ces cellules étant impliquées dans l'inhibition de la réplication du-VIH-1.

Cependant, il faut garder en tête que tous les EC ne présentent pas forcément de fortes réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1, suggérant que d'autres mécanismes doivent également contribuer au contrôle de l'infection (Sáez-Cirión et al., 2009).

#### *d. Réponse cytotoxique sous ART*

Comme pour les réponses T CD4<sup>+</sup>, les premières études des réponses T CD8<sup>+</sup> sous ART ont été réalisées après une mise sous traitement des patients en phase chronique de l'infection et elles ont montré une diminution des réponses spécifiques du VIH-1 (Kalams et al., 1999). Par contre, contrairement aux réponses T CD4<sup>+</sup>, même après avoir passé 10 ans sous ART, les patients ont des réponses T CD8<sup>+</sup> bien plus faibles que celles détectées chez des EC (Guihot et al., 2010). De plus, lorsque des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 sont détectés, ils produisent peu de perforine et possèdent le même phénotype de différenciation incomplète (CD27<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>) que celui retrouvé chez des patients en phase chronique non traités (Appay et al., 2002a). Malgré tout, il a été montré récemment dans le modèle macaque que les LT CD8<sup>+</sup> avaient un rôle dans le contrôle de la réplication virale sous ART (Cao et al., 2018; Cartwright et al., 2016). D'autre part, un traitement antirétroviral initié pendant la phase hyper-aiguë de l'infection a permis de changer le phénotype des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 et ainsi d'observer des LT<sub>EM</sub> (CD27<sup>-</sup>) exprimant les marqueurs Bcl2 et CD127 (Ndhlovu et al., 2019). Par contre, chez les patients PTC de la cohorte VISCONTI, il semble que les LT CD8<sup>+</sup> ne jouent pas un rôle prépondérant dans le contrôle de la charge virale. (Samri et al., 2016).

#### *e. Les molécules antivirales sécrétées par les LT CD8<sup>+</sup>*

Bien que la molécule Fas soit exprimée sur les cellules sur les LT CD4<sup>+</sup> infectées par le VIH-1, les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 lysent les cellules infectées par la voie de l'exocytose de granules cytotoxiques (Shankar et al., 1999). Il est également possible que la combinaison d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ , qui sont des cytokines sécrétées par les LT CD8<sup>+</sup>, soit cytotoxique pour les cellules infectées par le VIH (Biswas et al., 1994). Cependant, les LT CD8<sup>+</sup> peuvent également avoir une activité non-cytolytique en sécrétant des molécules qui vont inhiber la réplication virale.

En effet, il a été montré il y a plus de 30 ans que des LT CD8<sup>+</sup> provenant de patients séropositifs pour le VIH-1 en bonne santé avaient la capacité d'inhiber *in vitro* la réplication du virus de manière non cytolytique (Walker et al., 1986), en partie par un facteur soluble qui sera nommé plus tard « CD8 antiviral factor » ou CAF. De manière intéressante, la suppression de la réplication virale médiée par le CAF sécrété par des LT CD8<sup>+</sup> des tissus lymphoïdes a été associée au statut asymptomatique de patients infectés par le VIH (Blackbourn et al., 1996). La présence de fortes quantités de CAF a d'ailleurs également été mise en évidence chez des HESN (Stranford et al., 1999). Cependant, malgré les efforts déployés, ce facteur dont l'activité inhibitrice de la transcription du VIH-1 n'est pas restreinte par le CMH, n'a toujours pas été identifié (Levy, 2003).

Il a également été montré *in vitro* que la combinaison d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  pouvait réduire la réplication virale dans des cellules chroniquement infectées (Wong et al., 1988).

En 1995, les chimiokines RANTES, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (ligands du corécepteur CCR5) sont identifiées comme les facteurs suppressifs du VIH-1 produits par les LT CD8<sup>+</sup> (Cocchi et al., 1995). De manière intéressante, il a été montré que ces chimiokines étaient contenues dans les granules cytotoxiques des CTL (Wagner et al., 1998) et relarguées de manière antigène-spécifique (Price et al., 1998). En plus de bloquer l'accès au corécepteur CCR5, il a été montré que ces chimiokines inhibaient également la réplication du VIH-1 *in vitro* à une étape suivant l'entrée du virus dans la cellule (Amella et al., 2005). De manière intéressante, il a été montré chez des EC que le MIP-1 $\beta$  sécrété par des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 était l'un des facteurs solubles capable d'inhiber la réplication du virus T/F lors de la primo-infection (Freel et al., 2012). De plus, les quantités de MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  produits *in vitro* par les LT CD8<sup>+</sup> du sang périphérique provenant de patients infectés par le VIH-1 ont été associées au statut asymptomatique des patients (Cocchi et al., 2000). En outre, il a été montré que les chimiokines RANTES, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  sécrétées par les LT CD8<sup>+</sup> de patients LTNP avaient la capacité de supprimer la réplication du VIH-1 au sein du réservoir de LT CD4<sup>+</sup> quiescents (Chun et al., 2001).

D'autres molécules solubles suppressives du VIH-1 produites par les LT CD8<sup>+</sup> ont été identifiées et ces facteurs solubles peuvent utiliser différents mécanismes antiviraux pour inhiber la réplication virale (Cocchi et al., 2012; DeVico and Gallo, 2004).

Les LT CD8<sup>+</sup> sont donc particulièrement impliqués dans le contrôle de la réplication du VIH-1 (**Tableau 3**) comme en atteste la présence de CTL spécifiques du VIH-1 tant lors de la phase aiguë que la phase chronique de l'infection. L'importance de ces réponses chez les EC et les LTNP ainsi que les études récentes suggérant le rôle primordial des réponses T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques en primo-infection

quant au devenir du contrôle de la réplication virale en phase chronique (Ndhlovu et al., 2015; Trautmann et al., 2012) confirment la nécessité pour un vaccin anti-VIH-1 de générer ce type de réponses. De plus, la présence de CTL spécifiques du VIH-1 observée dans certaines cohortes d'individus HESN (Miyazawa et al., 2009; Tomescu et al., 2011) est un argument de plus en ce sens.

Corrélat	Auteurs
LT CD8 <sup>+</sup> polyclonaux	Pantaleo et al., 1997
LT CD8 <sup>+</sup> ciblant la protéine Gag	Rivière et al., 1995 ; Pontesilli et al., 1998 ; Edwards et al., 2002 ; Zuñiga et al., 2006
LT CD8 <sup>+</sup> ciblant la protéine Nef	Adland et al., 2013
LT CD8 <sup>+</sup> polyfonctionnels	Betts et al., 2006
LT CD8 <sup>+</sup> proliférant	Migueles et al., 2002 ; Ndhlovu et al., 2013
LT CD8 <sup>+</sup> inhibant la réplication du VIH-1	Saez-Cirion et al., 2007
LT CD8 <sup>+</sup> produisant du granzyme B	Migueles et al., 2008
LT CD8 <sup>+</sup> produisant de la perforine	Hersperger et al., 2010
LT CD8 <sup>+</sup> de forte avidité fonctionnelle	Mothe et al., 2012 ; Almeida et al., 2009
LT CD8 <sup>+</sup> ciblant des épitopes protecteurs	Gaiha et al., 2019
LT CD8 <sup>+</sup> sécrétant des chimiokines	Freel et al., 2012 ; Cocchi et al., 2000

**Tableau 3 : Principaux corrélats de contrôle de la réplication virale par les LT CD8<sup>+</sup> anti-VIH-1**

## **Troisième partie : Les vaccins anti-VIH**

### **I. Les stratégies de prévention non-vaccinale du VIH-1**

#### **1. Le préservatif**

La grande majorité des infections par le VIH-1 a lieu par voie sexuelle. Il existe donc un moyen simple et efficace de se protéger de cette infection comme des autres infections sexuellement transmissibles : le préservatif. En effet dès 1987, ce moyen de protection a été validé comme fiable contre le VIH-1 et son utilisation encouragée pour lutter contre le SIDA (Van de Perre et al., 1987). Cependant, son utilisation n'a jamais atteint le niveau escompté. Les résultats de l'étude nationale sur le comportement, l'incidence et la prévalence du VIH en Afrique du Sud de 2012 a par exemple montré que seulement 36% des personnes interrogées avaient utilisé un préservatif lors de leur dernier rapport sexuel ou encore que seulement 27% d'entre elles avaient utilisé systématiquement un préservatif avec leur dernier partenaire sexuel (Shisana et al., 2014). Pire encore, entre 2008 et 2012 l'utilisation du préservatif a baissé, et cette diminution d'utilisation du préservatif n'est pas limitée à l'Afrique du Sud. En France, un sondage publié en avril 2019 a montré que 19% des jeunes sexuellement actifs n'ont jamais utilisé de préservatif lors de leurs rapports sexuels des 12 derniers mois et que seulement 53% en ont utilisé de manière systématique (<https://fr.statista.com/statistiques/542578/jeunes-francais-ayant-utilise-preservatif-par-partenaire-sexuel-france/>).

Dans le monde, 35% des femmes ont subi des violences physiques ou sexuelles à un moment de leur vie (ONUSIDA, 2018), un facteur pouvant également aboutir à une utilisation limitée du préservatif. Même s'il existe un préservatif féminin pouvant permettre aux femmes d'être plus autonomes pour se protéger efficacement du VIH sans subir les mêmes pressions de la part du partenaire sexuel qu'avec l'utilisation d'un préservatif masculin, ce moyen de prévention reste encore malheureusement trop peu connu, cher et donc très peu utilisé. Enfin, comme l'ont fait comprendre lors de la dernière conférence HIVR4P (« HIV Research for Prevention ») à Madrid en 2018 les activistes des populations africaines mais également de la communauté homosexuelle, toutes deux confrontées à une forte prévalence du VIH-1, ces populations souhaitent avoir le choix d'utiliser d'autres moyens de prévention.

## **2. La circoncision**

Comme évoqué précédemment, la circoncision est également un moyen pour les hommes de diminuer significativement le risque d'acquisition du VIH-1. En effet, il a été montré que la circoncision réduisait le risque de transmission hétérosexuelle de 53% à 60% (Tobian et al., 2014).

## **3. Les molécules antivirales**

### ***i. Sous forme locale***

L'utilisation d'un gel vaginal contenant du tenofovir (inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse) a été évaluée chez des femmes en Afrique. Si les premiers résultats s'étaient avérés encourageants avec une réduction du taux global d'acquisition du VIH-1 de 39% (Abdool Karim et al., 2010), les études suivantes (essais cliniques de phase III) n'ont pas confirmé ces résultats et n'ont montré aucun effet de ce gel sur la réduction du taux d'acquisition du VIH-1 (Delany-Moretlwe et al., 2018; Marrazzo et al., 2015), mettant en avant le problème de la faible adhésion aux produits testés. Un autre microbicide a été testé en Afrique, la dapivirine (inhibiteur non-nucléosidique de la transcriptase inverse), incorporé cette fois au sein d'un anneau vaginal. Les résultats de deux essais de phase III ont montré une diminution du risque d'infection de l'ordre de 30% environ avec ce dispositif (Baeten et al., 2016; Nel et al., 2016).

### ***ii. Sous forme orale***

Aujourd'hui, le meilleur moyen de protection contre l'infection par le VIH-1 (outre le préservatif) est l'utilisation d'antirétroviraux sous forme orale. En effet, les résultats de divers essais cliniques ont montré que l'emtricitabine et le tenofovir disoproxil fumarate (Truvada), pris sous forme d'un comprimé par jour en prophylaxie de pré-exposition (« pre-exposure prophylaxis » ou PrEP) et traitement de post-exposition (TPE), avaient une efficacité d'environ 86% à prévenir l'infection par le VIH-1 chez des hommes homosexuels (McCormack et al., 2016; Molina et al., 2015). Les résultats se sont avérés beaucoup plus contrastés dans les études s'intéressant aux infections hétérosexuelles (Lelièvre, 2019), soulevant le problème de l'observance du traitement. Cependant, il a été montré qu'en cas d'observance parfaite, un taux de 100% de protection pouvait être atteint avec la PrEP (Marcus et al., 2017).

Un autre moyen de prévenir les infections par le VIH-1 est de diminuer suffisamment la charge virale des patients infectés pour qu'ils ne puissent pas transmettre le virus : il s'agit du traitement comme moyen de prévention (« treatment as prevention » ou TasP). En fait l'idée d'utiliser le 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. Il a été montré que les patients séropositifs pour le VIH-1 suivant correctement leur traitement antirétroviral (ART), composé généralement de trois molécules différentes parmi les inhibiteurs nucléosidique ou non-nucléosidique de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase (mais pouvant également contenir des inhibiteurs de l'intégrase, de fusion et du CCR5), et diminuant ainsi leur charge virale plasmatique sous les 200 copies/ml, n'étaient potentiellement plus contaminants (Rodger et al., 2019; Rodger et al., 2016). Si toutes les personnes infectées par le VIH-1 étaient identifiées et traitées efficacement, cela permettrait donc en théorie de stopper toute nouvelle contamination. Cependant, en réalité il n'est pas toujours facile de se faire dépister et traiter, notamment en Afrique subsaharienne (Suthar et al., 2013) où plus de 10 millions de personnes séropositives pour le VIH-1 n'ont pas accès au traitement antirétroviral en 2017 (ONUSIDA, 2018).

Comme l'affirmait le Docteur Fauci, directeur du NIH/NAID (« National Institute of Health/National Institute of Allergy and Infectious Diseases »), lors de la conférence HIVR4P de 2018, étant donné l'efficacité du préservatif et des traitements antiviraux, **en théorie** un vaccin prophylactique contre le VIH-1 ne serait pas nécessaire pour mettre fin à la pandémie de VIH/SIDA (Fauci, 2017). Cependant, bien que très efficaces, ces moyens de préventions actuels nécessitent une observance continue, ce qui ne serait pas le cas d'un vaccin préventif anti-VIH-1. En attendant ce vaccin préventif, l'ONUSIDA a lancé un programme ambitieux nommé 90-90-90 qui vise à arrêter la pandémie. Le but est que 90% des personnes infectées par le VIH dans le monde connaissent leur statut de séropositivité pour le VIH, 90% des personnes diagnostiquées séropositives pour VIH reçoivent un traitement antirétroviral, et 90% des personnes recevant leur traitement antirétroviral aient leur charge virale plasmatique indétectable (inférieure à 200 copies/ml). Rappelons qu'en 2017 seulement 75% des personnes vivant avec le VIH dans le monde connaissaient leur statut VIH ; parmi celles-ci, 79 % avaient accès au traitement ; et 81 % des personnes traitées avaient une charge virale plasmatique sous les 200 copies/ml. Cela représente un total de 47% des personnes vivant avec le VIH ayant une charge virale plasmatique supprimée (ONUSIDA, 2018).

#### 4. Les anticorps neutralisants à large spectre

Récemment (2016), deux essais évaluant l'efficacité du bNAb VRC01 comme moyen de prévention contre l'infection par le VIH-1 ont été lancés. Le premier en Afrique, chez des femmes à risque élevé d'infection par le VIH-1 (HVTN 703/HPTN 081) et le second aux USA, en Amérique du Sud et en Suisse chez des hommes et transgenres homosexuels (HVTN 704 / HPTN 085). Les résultats de ces deux essais sont attendus pour 2020. Ces essais ont vu le jour suite aux résultats montrant dans le modèle macaque qu'une seule injection d'un des 4 bNAbs suivants : VRC01, VRC01-LS, 3BNC117, ou 10-1074 pouvait protéger les singes d'une infection intrarectale hebdomadaire de SHIV pendant plusieurs semaines (Gautam et al., 2016). On pourrait à première vue se poser la question de l'intérêt d'utiliser des anticorps monoclonaux chers à produire et qui sont injectés par voie parentérale. En fait la réponse est simple, la demi-vie de ces anticorps est bien supérieure à celle des molécules antivirales. De plus, il a été montré que cette demi-vie pouvait être augmentée en modifiant le fragment Fc des anticorps, permettant ainsi une protection encore plus longue (médiane de 20 semaines après injection sous-cutanée des anticorps monoclonaux 3BNC117-LS et 10-1074-LS) dans le même modèle macaque que précédemment (Gautam et al., 2018). Cela pourrait ainsi se traduire à terme par une immunoprophylaxie réalisée 2 fois par an chez l'homme.

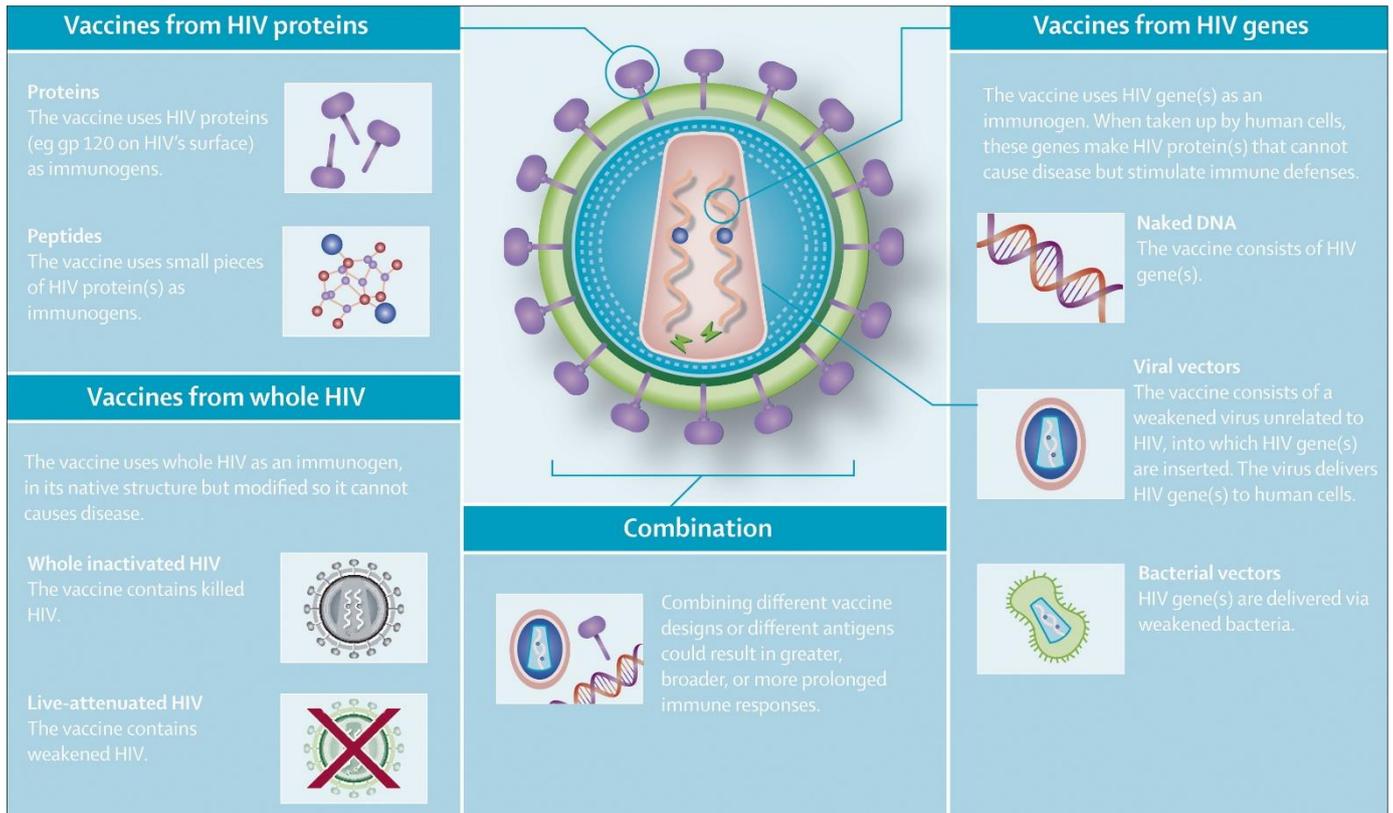
## II. Le vaccin préventif

### 1. Quel objectif pour la communauté scientifique ?

Différentes approches sont testées dans le but de générer un vaccin prophylactique contre le VIH-1 (Berkley and Koff, 2007) (Figure 35) et une des questions fondamentales dans la quête de ce vaccin est son efficacité. En effet, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, deux types différents de vaccins préventifs sont envisagés en terme de faisabilité par la communauté scientifique. Le premier, le vaccin idéal, serait un vaccin induisant des anticorps neutralisants à large spectre pour bloquer l'infection des cellules cibles mais induisant également des réponses cellulaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que des anticorps non-neutralisants permettant de générer une activité cytotoxique optimale afin de détruire les premières cellules infectées et empêcher une infection généralisée. L'autre vaccin, induisant essentiellement des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 de type effecteurs mémoires, génèrerait des réponses immunitaires n'empêchant pas l'infection généralisée, mais permettant un contrôle de la charge virale à long terme par l'élimination rapide des cellules infectées. Le premier type de vaccin est bien entendu la priorité de la recherche vaccinale, cependant

le deuxième type de vaccin n'est pas écarté malgré les questions qu'il peut soulever : risques de développement d'un SIDA en cas de perte du contrôle de la réplication virale, possibilité de transmission du virus...

La conclusion du dernier congrès HIVR4P de 2018 était qu'un vaccin efficace (empêchant l'infection généralisée) à 60% serait mis sur le marché. D'ailleurs, une étude publiée en 2017 montre que l'introduction d'un vaccin dont l'efficacité serait de 50% à 70% aurait un bénéfice sur la diminution de l'épidémie de VIH/SIDA dans 127 pays dont la France (Medlock et al., 2017).



**Figure 35 : Les différents candidats vaccins pour un vaccin préventif anti-VIH-1**

D'après Berkley & Koff, 2007.

## 2. Rétrospective historique

### i. Les stratégies empiriques pionnières

La première série de vaccination expérimentale humaine contre le VIH a été réalisée en 1986 par l'équipe du Professeur Zagury chez 12 volontaires séronégatifs pour le VIH (français et zairois) dont lui-même. Le vaccin injecté lors de la première immunisation était constitué du virus de la vaccine recombinante pour la protéine gp160 du VIH-1 (Zagury et al., 1988; Zagury et al., 1987). Le premier essai de phase I utilisant ce même type de vaccin a été réalisé entre 1988 et 1990 aux USA chez des

volontaires sains n'ayant pas été vaccinés contre la variole (Graham et al., 1992). Ces essais ont montré que le vaccin était sûr et qu'il induisait des réponses humorales et cellulaires. Ces essais ont été les précurseurs des stratégies utilisant des vecteurs recombinants atténués, qui se sont développés plus tard et dont nous parlerons dans les paragraphes suivants.

## ***ii. Les premières stratégies visant à induire des anticorps***

Pour la plupart des pathogènes pour lesquels un vaccin est disponible, la prévention de l'infection est corrélée avec l'induction d'anticorps spécifiques (Plotkin, 2010). Il est donc logique qu'après l'identification du VIH comme agent responsable du SIDA, la communauté scientifique ait travaillé à l'élaboration d'un vaccin capable d'induire des anticorps neutralisants contre le VIH. Dès 1985, des chercheurs ont démontré chez des sujets infectés par le VIH-1 la présence d'anticorps capables de bloquer l'infection des cellules ou d'inhiber la transmission de cellule à cellule *in vitro* (Robert-Guroff et al., 1985; Weiss et al., 1985).

Fort du récent succès obtenu avec la mise au point d'un vaccin sous-unitaire contre l'hépatite B constitué de la protéine recombinante de l'enveloppe de ce virus, un premier vaccin anti-VIH basé sur ce même modèle est approuvé pour un essai clinique chez l'homme aux USA dès 1987 (Merz, 1987). L'innocuité et l'immunogénicité du vaccin Vaxsyn, constitué de la protéine d'enveloppe du VIH-1 gp160 recombinante, sont alors évaluées chez 72 volontaires sains (Dolin et al., 1991). Parallèlement, les protéines recombinantes gp160 et gp120 sont testées dans des modèles animaux. En 1990, Berman et ses collègues montrent que la vaccination de chimpanzés avec la protéine d'enveloppe du VIH recombinante gp120, mais pas la gp160, les protège d'une infection par le VIH-1 (Berman et al., 1990). En 1992, Emini et ses collègues montrent notamment l'importance du domaine variable de la boucle V3 de la gp120 dans la prévention de l'infection par le VIH-1 chez des chimpanzés ayant reçu un anticorps monoclonal spécifique anti-V3 avant l'administration intraveineuse d'un VIH-1 (Emini et al., 1992). Cependant, il est ensuite montré que les anticorps anti-V3 ne sont capables de neutraliser que des souches de VIH-1 adaptées à la culture en laboratoire (Vancott et al., 1995). De plus, on observe que certains volontaires sains participants à des essais cliniques de vaccination prophylactique utilisant la gp120 recombinante du VIH-1 se sont infectés pendant ces essais, confirmant l'inefficacité de cette stratégie vaccinale (Connor et al., 1998; Kahn et al., 1995). En effet, ces vaccins induisent des anticorps neutralisants contre la souche vaccinale autologue et/ou des souches de VIH-1 adaptées à la culture en laboratoire, mais pas contre des souches hétérologues primaires (Mascola et al., 1996). Malgré tout, Vax 004 et Vax 003, les deux

premiers essais cliniques anti-VIH-1 de phase III (évaluant l'efficacité d'un vaccin à large échelle), sont lancés respectivement en 1998 et 1999 (**Tableau 4**).

Essai	Date	Candidats vaccins	Pays	Populations	Cible immunologique	Taux d'infections
Vax 004	1998-2002	gp120 (B/B) x 7 inj	Etats-Unis, Canada, Pays-Bas	5403 MSM et HRTS	Anticorps	6.7% groupe vaccinés 7.0% groupe placebo
Vax 003	1999-2002	gp120 (B/E) x 7 inj	Thaïlande	2546 UDI	Anticorps	8.4 % chez les vaccinés 8.3 % groupe placebo
Step	2004-2007	rAd5 (gag,pol,nef) (B) x 3 inj	Amérique (Nord et Sud), Australie	3000 MSM et HRTS	Lymphocytes T CD8+	4.6% groupe vaccinés 3,1% groupe placebo P= 0.07 <sup>1</sup>
Phambili	2007	rAd5 (gag,pol,nef) (B) x 3 inj	Afrique du Sud	801 HRTS <sup>2</sup>	Lymphocytes T CD8+	8.4% groupe vaccinés 7% groupe placebo
RV144 (Thaï trial)	2003-2009	<b>Prime:</b> ALVAC (gag,pol, env E) x 2 inj <b>Boost:</b> ALVAC (gag,pol, env E) + gp120 (B/E) x 2 inj <sup>4</sup>	Thaïlande	16402 population générale	Anticorps	0.192 % groupe vaccinés 0.279% groupe placebo P= 0.04 VE = 31% <sup>3</sup>
HVTN 505	2009-2013	<b>Prime:</b> DNA (gag, pol, nef, B) + DNA (env A/B/C) x 3 inj <b>Boost:</b> Ad5 (gag, pol, B) + Ad5 (env A/B/C) x 1 inj	Etats-Unis	2496 MSM	Lymphocytes T CD8+	2.7 % groupe vaccinés 2.1 % groupe placebo P= NS
HVTN702	2016-	<b>Prime:</b> ALVAC (gag,pol, env C) x 2 inj <b>Boost:</b> ALVAC (gag,pol, env C) + gp120 (C) x3 inj <sup>5</sup>	Afrique du Sud	5400 femmes	Anticorps	Essai clinique en cours
HVTN 705/ HPX 2008 « Imbokodo »	2017-	<b>Prime:</b> Ad26.Mos4.HIV x 2 inj <b>Boost:</b> Ad26.Mos4.HIV + gp140 (C) x 2 inj <sup>4</sup>	Afrique du Sud	2600 femmes	Anticorps	Essai clinique en cours
HVTN 706/ HPX 3002 « Mosaico »	2019-	<b>Prime:</b> Ad26.Mos4.HIV x 2 inj <b>Boost:</b> Ad26.Mos4.HIV + gp140 (C) x 2 inj <sup>4</sup>	Amérique (Nord et Sud), Europe	3800 MSM et transgenres	Anticorps	Essai clinique en cours

**Tableau 4 : Essais cliniques de vaccins préventifs anti-VIH-1 de phase IIb/III**

Adapté d'après Lelievre JD, Vaccin VIH état de l'art Livre AFRAVIH 2019 in press. 1. Analyse de toutes les infections sauf une chez les hommes dans l'essai Step, 2. Le recrutement de 3000 patients était initialement prévu mais l'essai a été arrêté après les résultats de l'essai Step, 3. Analyse en intention de traité modifié, 4. Utilisation du MF59 comme adjuvant, 5. Utilisation d'alum comme adjuvant. (HRTS : Haut risque de transmission hétérosexuelle ; MSM : hommes homosexuels ; UDI : Utilisateurs de drogues injectables par voie intraveineuse ; VE = efficacité du vaccin)

Le vaccin de l'essai Vax 004 est composé de deux protéines gp120 recombinantes de sous-type B (souches MN et GNE8). Ce vaccin est testé chez plus de 5000 volontaires au sein de la population homosexuelle masculine ainsi que chez les femmes à haut risque d'infection par voie hétérosexuelle aux USA, au Canada, et aux Pays-Bas. Le vaccin de l'essai Vax 003, qui est testé chez plus de 2500 utilisateurs de drogues injectables en Thaïlande, est composé de 2 protéines gp120 recombinantes : une de sous-type B (souche MN) et une autre de sous-type CRF\_AE (souche A244). Comme on pouvait s'y attendre, aucun de ces deux essais n'a montré de réduction statistiquement significative d'infection par le VIH-1 chez les vaccinés (Flynn et al., 2005; Pitisuttithum et al., 2006) (Tableau 4).

Un autre type de vaccin pouvant induire des anticorps neutralisants est le vaccin inactivé. D'ailleurs, ce type de vaccin a prouvé son efficacité contre la polyomyélite, la grippe ou encore l'hépatite A. Les premiers tests d'injections de VIS inactivés réalisés chez le macaque ont montré une protection contre une infection par des VIS autologues (Murphey-Corb et al., 1989; Stott et al., 1990). Cependant, l'enthousiasme généré par ces premiers résultats est vite retombé lorsqu'il a été montré que la protection était due non pas à une réponse spécifique anti-VIS, mais à une réponse anticorps dirigée contre les molécules HLA de classe I et II présentes sur les cellules humaines ayant servi à la production des virus et s'étant incorporées dans les virions (Arthur et al., 1995; Chan et al., 1992). De plus, cette approche n'étant pas sans danger (il pourrait rester du virus vivant infectieux après le procédé d'inactivation), elle n'a pas été développée comme vaccin préventif chez l'homme.

### ***iii. Les stratégies visant à induire des LT CD8<sup>+</sup>***

Devant les difficultés à induire des anticorps neutralisants dirigés contre des souches primaires de VIH-1 avec des protéines d'enveloppe recombinantes, et compte-tenu de la démonstration de l'importance des CTL dans l'immunité protectrice contre certains virus (Zinkernagel RM, 1976), la communauté scientifique s'est ensuite focalisée sur l'induction de réponses cellulaires anti-VIH-1. L'idée était que même si un vaccin à base de CTL ne pouvait pas empêcher l'infection par le VIH-1, il pourrait peut-être permettre un contrôle de la charge virale après l'infection, voire même une éradication du virus. Pour ce faire, diverses stratégies ont été développées : vaccins vivants recombinants, vaccins ADN ou encore lipopeptides (nous parlerons de cette dernière stratégie plus en détail dans la dernière partie de cette introduction).

Une des manières bien connue d'obtenir des CTL est l'utilisation de vaccins atténués. En effet, ce type de vaccin qui permet de générer une réponse immunitaire complète constituée de CTL et d'anticorps est l'approche traditionnelle utilisée pour la vaccination contre les virus de la rougeole, la rubéole, les oreillons, la fièvre jaune et la varicelle/zona. Cependant l'utilisation d'un vaccin VIH-1

atténué est difficilement envisageable chez l'homme. En effet, même si l'efficacité d'un vaccin VIS délété dans le gène Nef a prouvé son efficacité chez le macaque (Daniel et al., 1992), la possibilité pour ce type de vaccin d'induire un SIDA a également été démontrée (Baba et al., 1999). De plus, comme le VIH-1 met une dizaine d'année environ à induire un SIDA, il n'est pas possible d'être assuré d'une innocuité à long terme d'un vaccin VIH-1 atténué (Chiodi and Weiss, 2014), d'autant plus que le génome du virus va s'intégrer au génome des cellules infectées.

De ce fait, le développement de différents vecteurs vivants recombinants contenant des parties du génome du VIH-1 s'est accéléré dans les années 1990-2000, particulièrement la famille des poxvirus avec le canarypox (ALVAC) et les virus de la vaccine atténuée (NYVAC et MVA) ; ou encore des adénovirus (de sérotype 5, 26 et 35) (Girard et al., 2011; Johnson et al., 2013). Les deux essais de phase IIb HVTN 502 (STEP) et HVTN 503 (Phambili), utilisant comme vaccin un adénovirus recombinant de sérotype 5 (rAd5) exprimant les protéines Gag, Pol et Nef du VIH-1 de sous-type B sont lancés en 2004 et 2007, respectivement (**Tableau 4**).

L'essai HVTN 502 (STEP) est mené chez 3000 volontaires d'Amérique du Nord, des Caraïbes, d'Amérique de Sud et d'Australie incluant des homosexuels de sexe masculin ainsi que des hommes et femmes hétérosexuels. Malgré la détection de réponses T CD8<sup>+</sup> (McElrath et al., 2008), cet essai ne montre aucune protection chez les vaccinés, ni même de diminution de la charge virale chez les vaccinés infectés (Buchbinder et al., 2008). Le nombre d'infection est même significativement plus élevé chez les hommes non-circoncis vaccinés et séropositifs pour l'Ad5 que chez les placebos. Ces résultats entraînent en 2007 l'arrêt de cet essai ainsi que l'arrêt de l'enrôlement des volontaires pour l'essai HVTN 503 (801 vaccinés au lieu des 3000 prévus) réalisé en Afrique du Sud chez des hommes et femmes hétérosexuels. L'analyse des résultats de l'essai HVTN 503 ne montrera également aucun bénéfice de la vaccination (Gray et al., 2011; Moodie et al., 2015). Cependant, des analyses effectuées chez les volontaires vaccinés s'étant infectés au cours de l'essai STEP vont montrer que malgré la faible intensité et la faible étendue des réponses T CD8<sup>+</sup> induites par le vaccin, ces réponses semblent avoir été suffisamment fortes pour avoir généré un échappement spécifique du virus initialement transmis (Li et al., 2011; Rolland et al., 2011). De plus, chez les vaccinés infectés ayant des réponses T contre au moins 3 épitopes de la protéine Gag, il a été observé une diminution de la charge virale plasmatique par rapport aux individus vaccinés ne présentant pas de réponses contre Gag (Janes et al., 2013). L'impact négatif de l'immunité anti-vecteur également observé lors de l'essai STEP a conduit au développement d'adénovirus recombinant d'autres sérotypes que l'Ad5, moins fréquents dans la population humaine, comme l'Ad26 et l'Ad35.

Outre les vecteurs vivants recombinants, un autre type de vaccin permettant l'induction de CTL s'est développé à partir des années 1990 : le vaccin ADN (Chen et al., 2014; Girard et al., 2011; Ramirez et al., 2013). Il s'agit en fait d'un plasmide contenant les gènes des protéines que l'on souhaite faire exprimer par la cellule cible comme par exemple les protéines Gag, Pol et Nef du VIH-1 (Graham et al., 2006). Généralement, ce type de vaccin est utilisé dans des stratégies dites de « prime-boost » permettant l'induction de fortes réponses cellulaires (Ramshaw IA, 2000). En effet, il a été observé que l'immunogénicité des vecteurs viraux recombinants était significativement améliorée lorsqu'ils étaient injectés sous forme de « boost » après une immunisation initiale (« prime ») avec un vaccin ADN (Girard et al., 2011). Ces stratégies de « prime-boost » ont en fait été mises en place pour le développement de vaccins contre différentes infections virales dans le but d'augmenter les réponses cellulaires et humorales.

On distingue deux types principaux de « prime-boost » : les « prime-boost » homologues utilisant le même antigène délivré plusieurs fois par le même vecteur (vaccination classique), et les « prime-boost » hétérologues utilisant le même antigène délivré par des vecteurs différents. Dans de nombreux cas, les « prime-boost » hétérologues se sont avérés plus immunogènes que les « prime-boost homologues » (Kardani et al., 2016). En effet, le « prime-boost » hétérologue permet de limiter le nombre d'injections avec un vecteur vivant recombinant et ainsi d'éviter que le système immunitaire ne génère une trop forte réponse anticorps anti-vecteur pouvant limiter son efficacité. Cela permet donc au système immunitaire de focaliser les réponses sur les inserts vaccinaux. Enfin on peut distinguer également deux catégories de « prime-boost » hétérologues : ceux basés sur des inserts homologues et ceux basés sur des inserts hétérologues. Il a d'ailleurs été montré qu'une vaccination avec des séquences hétérologues de l'enveloppe du VIH-1 (sous-type A et sous-type B) et des vecteurs hétérologues (Ad5 et Ad35) permettait d'augmenter les réponses T spécifiques des régions conservées du VIH-1 (Walsh et al., 2016).

L'essai de phase III HVTN 505, utilisant une stratégie de « prime-boost » hétérologue, a été lancé aux USA en 2009. Cet essai a évalué l'efficacité d'un vaccin ADN consistant en 6 plasmides (exprimant Gag, Pol, Nef du sous-type B + Env des sous-types A, B, C) en « prime » et quatre rAd5 (1 exprimant Gag/Pol du sous-type B + 3 exprimant Env des sous-types A, B, C) en « boost » chez environ 2500 volontaires (Tableau 4). Étant donné le précédent concernant l'Ad5 utilisé dans l'essai STEP, seuls des hommes homosexuels circoncis et n'ayant pas d'anticorps préexistant contre l'Ad5 ont été vaccinés. Cet essai a été stoppé avant la fin pour inutilité. En effet, les résultats de cet essai montraient que le schéma vaccinal n'avait pas réduit le taux d'infection par le VIH-1, ni même influé sur la charge virale des vaccinés infectés (Hammer et al., 2013). De manière surprenante, il a récemment été montré que

l'intensité et la polyfonctionnalité des réponses T CD8<sup>+</sup> dirigées contre Env étaient inversement corrélées avec le risque d'infection par le VIH-1 dans cet essai (Janes et al., 2017).

#### *iv. L'essai Thaï RV144*

Le premier essai de phase III ayant utilisé une stratégie « prime-boost » hétérologue a été l'essai RV144. Cet essai réalisé en Thaïlande entre 2003 et 2009 chez plus de 16 000 volontaires (hommes et femmes ayant principalement un risque d'infection par voie hétérosexuelle) a testé l'efficacité d'un schéma vaccinal utilisant en « prime » un canarypox recombinant pour les protéines du VIH-1 Gag, Protéase et gp41 de sous-type B et gp120 de sous-type CRF\_AE (ALVAC vCP1521), et en « boost » ce même ALVAC en association avec une protéine recombinante gp120 bivalente de sous-type B/E (**Tableau 4**). Les résultats de cet essai ont montré une réduction de l'infection par le VIH-1 de 31,2% après 42 mois de suivi (Rerks-Ngarm et al., 2009) et même de 60,5% 12 mois après la dernière vaccination (Robb et al., 2012). Par contre, la vaccination n'a pas permis de diminuer la charge virale chez les vaccinés infectés. De nombreuses études ont été réalisées pour identifier les corrélats de protection de cet essai et ont notamment été identifiés :

- la présence d'IgG spécifiques de la région V1-V2 de l'enveloppe (Haynes et al., 2012), particulièrement du sous-type IgG3 associé à l'activité ADCC et ADCP (Chung et al., 2014; Chung et al., 2015; Yates et al., 2014),
- la présence d'IgG spécifiques d'épitopes linéaires des régions V2 et V3 de la gp120 (Gottardo et al., 2013),
- la présence d'une réponse T CD4<sup>+</sup> polyfonctionnelle (Lin et al., 2015),
- un polymorphisme dans le gène FCGR2C (Li et al., 2014),

Par contre, la présence d'IgA a été associée à un risque accru d'infection (Haynes et al., 2012). En effet il a été montré que les IgA anti-gp120 induits par la vaccination entraient en compétition avec les IgG, les empêchant de se fixer sur la gp120 et bloquant ainsi leur activité ADCC (Tomaras et al., 2013).

Une compilation des différents corrélats de protection retrouvés dans les différents essais d'efficacité a récemment été publiée et est présentée en **Tableau 5** (Tomaras and Plotkin, 2017). De manière intéressante, il a été récemment montré que les corrélats de protection lors de l'infection naturelle étaient les mêmes que ceux identifiés dans l'essai RV144 : anticorps dirigés contre la région V1-V2 de l'enveloppe, ADCC contre des cellules exprimant la protéine d'enveloppe en conformation ouverte et exposant le site de liaison au CD4, et présence d'un faible ratio IgA/IgG dans le plasma (Tuen et al., 2019).

Vaccine regimen	Location/risk population	Overall vaccine efficacy	Increased risk of infection	Immune correlates of decreased vaccine efficacy <sup>a</sup>	Immune correlates of decreased HIV risk	Immune correlates of immune control post infection	Virus sieve	Host genetic correlates
VAX003 (Phase III) Protein/ Alum (CRF01_AE/Clade B Env) <sup>52</sup>	Thailand/injection drug users	No efficacy	No	No	No <sup>52</sup>	No	No <sup>118,b</sup>	n/d
VAX004 (Phase III) Protein/ Alum (Clade B Envs) <sup>53</sup>	USA/MSM/high risk women	No efficacy	No	No	Yes ADCVI, CD4 Blocking, Tier 1 NAb	n/d	No <sup>160,161</sup>	Yes Fcγ receptor IIIa genotype (VV genotype) <sup>125</sup>
STEP HVTN502 (Phase IIb) Ad5 Vector (Clade B Gag/Pol Nef) <sup>54</sup>	North/South America, Australia, Caribbean/MSM and High Risk Hetero-sexual Men and Women	No efficacy <sup>c</sup>	Yes	n/d	No	Yes T cell breadth/ magnitude, Lower VL	Yes <sup>67</sup>	Yes HLA alleles (B*27, B*57, B*58:01), Lower viral load
Phambili HVTN503 (Phase IIb) Ad5 Vector (Clade B Gag/Pol Nef) <sup>57</sup>	South Africa/Hetero-sexual Men and Women	No efficacy <sup>d</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
RV144 (Phase III) ALVAC vector (Clade B Gag/Pro + CRF01_A/E Env) + Protein/ Alum (CRF01_AE/B Env) <sup>50</sup>	Thailand/Community	31% efficacy	No	Yes Plasma Env IgA <sup>71,74</sup>	Yes V1V2 IgG, Linear V2, V1V2 IgG3, Interactions (ADCC, Avidity, Tier 1 NAb, IgA), CD4 <sup>+</sup> T cell Polyfunction, Cytokines <sup>71-73,75,111</sup>	n/d	Yes <sup>85,162</sup>	Yes HLA A*02 allele <sup>126</sup> ; FcγRIIC -118 L allele <sup>114</sup> ; DQB1*06 <sup>113</sup>
HVTN505 (Phase IIb) DNA/ Ad5 (Clade A, B, C Env, Clade BGag/Pol) <sup>60</sup>	USA/MSM and TG, Ad5 seronegative, Circumcised	No efficacy <sup>c</sup>	No	No	Yes CD8 <sup>+</sup> Env T-cell Polyfunction <sup>e</sup>	n/d	Yes <sup>66</sup>	n/d

The six HIV-1 vaccine efficacy studies are listed alongside their corresponding outcomes for vaccine efficacy, immune correlates of risk, and associations of vaccine efficacy with virus sieve analysis and host genetics. Findings with positive outcomes for vaccine efficacy are shaded in blue and findings with negative outcomes for vaccine efficacy are shaded in gray. MSM = Men who have sex with Men; TG = transgender; ADCVI = antibody-dependent, cell-mediated virus inhibition; Tier 1 NAb = neutralizing antibodies that target easy to neutralize viruses (ie not circulating transmitted/founder viruses); V = Valine, FcγRIIIa is encoded by alleles that confer either a phenylalanine (F) or valine (V) at amino acid position 158.

<sup>a</sup>No increased risk of infection compared to the placebo group.

<sup>b</sup>No significant virus sieve that correlated with acquisition. An atypical genetic sieve in the V2 region was identified but also did not correlate with acquisition.

<sup>c</sup>Efficacy futility determined at first interim analysis after full enrollment.

<sup>d</sup>Vaccinations discontinued: unblinded early based on STEP result.

<sup>e</sup>Frahm N, McElrath MJ et al. (2016) Research for Prevention Meeting, Chicago, IL

**Tableau 5 : Principaux corrélats de protection retrouvés dans les différents essais d'efficacité anti-VIH-1**

D'après Tomaras & Plotkin, 2017

### 3. Et maintenant ?

#### *i. Les essais post-RV144*

Après la déception des essais Vax 003, Vax 004, STEP et Phambili, Les résultats de RV144 ont redonné un nouveau souffle à la recherche d'un vaccin prophylactique contre le VIH-1 (Lelievre and Levy, 2016). Plusieurs essais se calquant sur le design de RV144, tout en essayant de l'améliorer ont été lancés comme notamment l'essai de phase IIb HVTN 702 lancé en Afrique du Sud et qui prévoit l'inclusion de 5400 volontaires sains, hommes et femmes sexuellement actifs. Cet essai dont les résultats sont attendus fin 2020 évalue l'efficacité d'un ALVAC de sous-type C avec une protéine recombinante de sous-type C injectée avec l'adjuvant MF59 (Tableau 4). Les résultats de cet essai sont très attendus concernant l'avenir de l'adjuvant MF59 car une étude comparant dans le modèle macaque le schéma vaccinal de l'essai RV144 (ALVAC-VIS + gp120 adjuvantée par alum) avec celui d'HVTN 702 (ALVAC-VIS + gp120 adjuvantée par MF59) a montré que seul le schéma vaccinal de RV144 permettait de retarder l'infection après plusieurs injections intrarectales de VIS. Dans cette étude, l'efficacité vaccinale était associée notamment à l'effet de l'alum sur l'induction au niveau des muqueuses d'ILC spécifiques de l'enveloppe et sécrétant de l'IL-17 ainsi que d'IgG anti-V2 (Vaccari et al., 2016). De nombreux autres essais de phase I et II sont également en cours utilisant plusieurs vecteurs différents dans des stratégies de « prime-boost » (Excler and Kim, 2019; Hsu and O'Connell, 2017). De plus, la recherche concernant l'optimisation des vaccins dans le but d'induire des bNAbs et d'améliorer la réponse cellulaire continue activement.

#### *ii. Les stratégies actuelles visant à induire des bNAbs*

Bien qu'un grand nombre de bNAbs aient été identifiés chez des patients séropositifs pour le VIH-1 (Mouquet, 2014) et que certains soient testés en prophylaxie de pré- ou post-exposition (Caskey et al., 2019), l'induction de tels anticorps par un vaccin est difficile du fait de la nature même de ces anticorps : nombreuses mutations somatiques, long CDR3 sur la chaîne lourde, auto-réactivité importante (Mascola and Haynes, 2013). Différentes stratégies sont tout de même développées afin de générer l'induction de ces anticorps par des vaccins, comme l'utilisation de SOSIP (glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 ayant une structure stabilisée représentant la conformation native de la gp140), de protéines d'enveloppe construites afin d'activer les prédécesseurs de la lignée germinale de bNAbs (comme eOD-GT8) ou encore de vaccinations séquentielles avec différents variants de la protéine d'enveloppe afin d'induire le développement de bNAbs (Cohen and Frahm, 2017; Hsu and O'Connell, 2017).

### **iii. Les stratégies actuelles visant à induire des LT CD8<sup>+</sup>**

Concernant les vaccins ayant pour but d'induire des réponses cellulaires, plusieurs stratégies sont développées afin d'améliorer ces vaccins :

- Tout d'abord, l'augmentation de l'étendue et de l'intensité des réponses avec l'utilisation par exemple de nouveaux vecteurs recombinants réplicatifs (Parks et al., 2013). Le vaccin le plus avancé utilisant ce type de vecteur est un CMV recombinant induisant de fortes réponses T effectrices mémoires (Hansen et al., 2011). En effet, 50% des macaques ayant reçu ce type de vaccin et ayant été ensuite infectés par un VIS par voie intravaginale, intrarectale ou intraveineuse ont montré un contrôle efficace de la charge virale, et même une élimination progressive du virus de l'organisme (Hansen et al., 2013a). De manière intéressante, il a été montré que ce vaccin induisait des réponses T CD8<sup>+</sup> spécifiques de Gag particulières car restreintes en grande partie par le CMH de classe II (Hansen et al., 2013b) mais également par les molécules du CMH-E non classique de classe Ib (Hansen et al., 2016). Cependant, le problème majeur de ce vaccin est qu'il est basé sur une souche particulière de CMV de singe dont l'équivalent chez l'homme n'a pas encore permis l'induction de ces réponses particulières (Murray et al., 2017).

- Ensuite, la focalisation des réponses sur les zones hautement conservées du VIH pour limiter l'échappement du virus à la réponse immunitaire (Rolland et al., 2007; Yang, 2009). Un vaccin contenant des fragments conservés du VIH-1 de différents sous-types a également été conçu afin de générer une immunité universelle (Létourneau et al., 2007). Cette dernière stratégie utilisant plusieurs vecteurs (adénovirus recombinant, MVA recombinant et vaccin ADN) dans des stratégies de « prime-boost » a permis l'induction des plus fortes réponses T anti-VIH observées après vaccination chez l'homme à ce jour (Borthwick et al., 2014; Mutua et al., 2016). De plus, les LT CD8<sup>+</sup> induits par la vaccination sont capables *in vitro* d'inhiber la réplication du VIH (Ahmed et al., 2016).

- Ou encore la sélection d'épitopes induisant des réponses de forte avidité associées à un contrôle de la réplication virale (Mothe et al., 2011).

- Enfin, la génération de vaccins mosaïques contenant plusieurs variations de séquences protéiques du VIH-1 afin d'augmenter le nombre potentiel d'épitopes pouvant être reconnus à l'échelle de la population (Fischer et al., 2007). Ce type de vaccin mosaïque testé récemment en parallèle chez l'homme et chez le singe a permis de montrer que le schéma vaccinal utilisant 2 « prime » Ad26.Mos.HIV (exprimant les gènes mosaïques Env/Gag/Pol) puis 2 « boost » Ad26.Mos.HIV + Env gp140 de sous-type C (adjuvantée avec de l'alum) était très immunogène chez l'homme. En effet, cette combinaison a permis l'induction de réponses anticorps spécifiques de l'enveloppe du VIH-1 et des réponses T chez respectivement 100% et 83% des vaccinés. De plus, cette même combinaison vaccinale a permis la protection de 77% des macaques contre une infection

par un SHIV. De manière intéressante, les réponses humorales et cellulaires dirigées contre l'enveloppe du VIH-1 sont les corrélats de protection trouvés dans cet essai (Barouch et al., 2018). Ces résultats ont permis le récent lancement de deux essais d'efficacité de phase IIb basés sur ce schéma vaccinal : HVTN 705/HPX2008 (Imbokodo), ayant pour population cible 2600 femmes d'Afrique subsaharienne séronégatives pour le VIH-1 et HVTN 706/HPX3002 (Mosaico) ayant pour population cible 3800 hommes homosexuels ou transgenres séronégatifs pour le VIH-1 en Amérique du Nord, Amérique du Sud et en Europe (Tableau 4).

### III. Le vaccin thérapeutique

#### 1. VIH/SIDA : objectif guérison

Même si l'introduction à la fin des années 1990 de la thérapie antirétrovirale combinée (cART) a permis de réduire la mortalité et la morbidité liées au VIH (Palella et al., 1998) ainsi que le risque de transmission du virus (Rodger et al., 2019; Rodger et al., 2016), à ce jour 41% des personnes infectées par le VIH dans le monde n'ont pas accès au traitement antirétroviral (ONUSIDA, 2018). De plus, même si la thérapie antirétrovirale permet un contrôle de la charge virale, elle ne permet pas l'éradication du virus et le traitement doit être pris pendant toute la vie de l'individu. Cela peut poser un problème d'observance thérapeutique qui peut avoir pour conséquences un rebond de la charge virale et la possible contamination du partenaire sexuel mais également l'émergence de souches résistantes au traitement antirétroviral suite à l'apparition de mutations d'échappement au traitement (Nachega et al., 2011). De plus, comparés à des individus non-infectés par le VIH, les patients séropositifs pour le VIH souffrent tout de même plus de comorbidités non transmissibles liées à l'âge de nature cardio-vasculaires, rénales ou hépatiques (Schouten et al., 2014). En outre, le temps médian de survie estimé chez des patients séropositifs pour le VIH-1 traités efficacement de 50 ans ou plus reste inférieur à celui de la population générale (Legarth et al., 2016). A ce jour, seule une transplantation de cellules souches hématopoïétiques réalisée à l'aide de cellules homozygotes pour la délétion CCR5 $\Delta$ 32 a permis l'éradication du VIH-1 et la guérison totale chez deux patients séropositifs pour le VIH-1 atteints de cancer (Allers et al., 2011; Gupta et al., 2019). Cependant, ce traitement est très lourd et il ne peut pas être envisagé à l'ensemble des personnes infectées par le VIH.

Les stratégies considérées aujourd'hui pour guérir du VIH/SIDA se basent notamment sur l'élaboration d'un vaccin thérapeutique. Dans la médecine contemporaine, le terme de vaccin est

généralement utilisé dans le contexte d'une prophylaxie de pré-exposition où un antigène est administré à des individus sains afin d'éviter une possible infection par un agent pathogène. Des vaccins peuvent également parfois être injectés rapidement après une exposition à un pathogène (avant les signes cliniques de la maladie) dans le cas d'une prophylaxie de post-exposition, comme c'est le cas pour la rage. Mais des vaccins peuvent aussi être injectés après qu'une infection se soit installée et ait engendré des signes cliniques, il s'agit alors de vaccination thérapeutique. Si ce terme peut sembler être un oxymore, il est pourtant utilisé depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle. En effet, la vaccination thérapeutique est un concept introduit en 1850 par Auzias-Turenne lorsqu'il a proposé de traiter la syphilis par une vaccination syphilitique ou syphilisation. Ensuite, Robert Koch a été le premier à montrer en 1890 qu'une réponse immunitaire naturelle pouvait être boostée dans ses expériences de vaccination thérapeutique contre la tuberculose. Puis Almroth Wright fût le premier à exposer une théorie générale de la vaccination thérapeutique au début des années 1900 (Burke, 1993). Cependant l'efficacité de la vaccination thérapeutique n'a encore jamais été irréfutablement prouvée. Dans le cas de l'infection par le VIH-1, la vaccination thérapeutique a pour but d'induire et/ou d'augmenter les réponses cellulaires spécifiques du virus chez des patients sous traitement antirétroviral, afin de permettre un meilleur contrôle de l'infection et d'empêcher une évolution vers le SIDA après un arrêt du traitement antirétroviral (Autran et al., 2004; Peters, 2002), voire dans le meilleur des cas d'éliminer totalement le virus et de guérir de l'infection (Autran, 2015; Mylvaganam et al., 2015).

## **2. Différentes stratégies vaccinales pour un vaccin thérapeutique anti-VIH-1**

### ***i. Rétrospective historique des stratégies « classiques »***

Comme pour le vaccin prophylactique, les essais de vaccination thérapeutique anti-VIH-1 ont commencé tôt. En fait, les premières expériences d'immunothérapie cellulaires datent même de 1986, à Kinshasa, où des patients africains infectés par le VIH-1 vont recevoir des cellules autologues inactivées infectées par le VIH ou le virus de la vaccine recombinant exprimant la protéine gp160 du VIH (Zagury, 1991). Le premier essai de phase I consistant en des injections intraveineuses, intramusculaires et sous-cutanées de LB autologues infectés par un virus de la vaccine recombinant pour les protéines Gag, Pol et Env du VIH-1 a lieu dès 1989 en France (Picard et al., 1990), mais pour des raisons de sécurité concernant l'inactivation des cellules en plus de l'absence de restauration de l'immunité cellulaire, ce protocole sera arrêté (Zagury, 1991). De l'autre côté de l'océan atlantique, l'idée de vacciner des personnes infectées par le VIH-1 est proposée en 1987 par Salk (Salk, 1987). Un premier essai utilisant un vaccin à base de VIH-1 inactivé déplété de la protéine gp120 injecté avec

l'adjuvant incomplet de Freund (Remune) chez des patients séropositifs pour le VIH est lancé la même année (Levine et al., 1996). Ce vaccin a été testé dans de nombreux essais mais son efficacité clinique n'a pas été prouvée de manière claire (Graziani and Angel, 2016). La gp160 recombinante, qui a été testée dès 1987 chez des volontaires sains est également testée chez des sujets infectés par le VIH et le premier essai thérapeutique de phase I utilisant ce vaccin, montrant que la gp160 recombinante est immunogénique chez les patients séropositifs pour le VIH-1, est publié en 1991 (Redfield et al., 1991). Cependant, quelques années plus tard un essai de phase II ne montrera aucune efficacité clinique de la gp160 recombinante (Tsoukas et al., 1998). Le premier essai de vaccination thérapeutique anti-VIH utilisant un vaccin ADN est publié en 1998 (MacGregor et al., 1998). Des vecteurs viraux recombinants comme les canarypox (ALVAC) vont ensuite être testés. Les résultats de l'essai QUEST, évaluant l'impact du vCP1452 (ALVAC recombinant pour les protéines Gag, Pol et Nef du VIH-1) en association ou non avec Remune chez des patients infectés par le VIH-1 ayant commencé la thérapie antirétrovirale en phase aiguë de l'infection, ont montré que malgré l'induction de réponses cellulaires anti-VIH-1, les différentes combinaisons vaccinales n'induisaient pas de contrôle de la réplication virale après arrêt du traitement (Kinloch-de Loes et al., 2005). De nombreux autres essais de vaccination thérapeutique anti-VIH utilisant ces stratégies « classiques » ont été réalisés ou sont en cours (Pantaleo and Levy, 2016). De manière générale, les résultats de ces essais de phase I ou II, réalisés en phase aiguë ou en phase chronique de l'infection, utilisant notamment des vaccins ADN et des vecteurs recombinants (ALVAC, MVA, adénovirus), ainsi que des protéines, peptides et lipopeptides dans différentes stratégies vaccinales, se sont avérés décevants (Carcelain and Autran, 2013; Fleury et al., 2018).

### ***ii. La stratégie lipopeptide***

Comme nous venons de le voir, différentes stratégies ont été et sont encore développées afin de trouver un vaccin thérapeutique efficace contre le VIH-1. Comme les bases de l'immunité cellulaire reposent sur la présentation de peptides aux LT par les APC, et notamment la reconnaissance de peptides présentés par les molécules HLA de classe I pour les LT CD8<sup>+</sup> (Townsend et al., 1986), une approche vaccinale basée sur des peptides a commencé à émerger à la fin des années 1980. Les avantages d'une telle approche, comparée aux autres types de vaccins plus conventionnels, étant la pureté, l'uniformité entre les lots, les faibles coûts de production, mais également la spécificité dans l'induction des réponses immunitaires. Néanmoins, le vaccin peptidique a un inconvénient : sa faible immunogénicité. En effet, pour induire des réponses immunitaires, les peptides ont besoin d'être injectés avec des adjuvants puissants, pas forcément compatibles avec une utilisation chez

l'homme. Cependant, en 1989, Deres et ses collaborateurs montrent pour la première fois l'immunogénicité de peptides liés de manière covalente à une molécule lipidique : les lipopeptides (Deres et al., 1989). L'ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites) décide alors de se lancer dans cette voie en joignant les efforts d'immunologistes, de biologistes et de chimistes, dans un programme original combinant science fondamentale et recherche clinique afin de développer un vaccin anti-VIH-1 à base de lipopeptides permettant d'induire des réponses cellulaires poly-épitopiques (Choppin, 2008; Fischer et al., 2005; Gahery et al., 2005; Surenaud et al., 2017).

Après la démonstration d'une association physique entre les molécules HLA de classe I et les peptides immunogéniques (Bouillot et al., 1989), les régions des différentes protéines du VIH-1 capables de se lier à plusieurs molécules HLA de classe I sont identifiées (Choppin et al., 1991a; Choppin et al., 1991b). Puis des séquences du VIH-1 relativement conservées et riches en épitopes T CD8<sup>+</sup> sont identifiées comme la partie centrale de la protéine Nef (Culmann-Penciolelli et al., 1994), ou encore dans les protéines Gag p17 et p24 (Buseyne et al., 1993; Johnson et al., 1991). Dans le même temps, il est montré qu'une construction lipopeptidique contenant une séquence de 34 acides aminés provenant de l'enveloppe du VIH-1, injectée sans adjuvant chez la souris, permet l'induction de réponses CTL, HTL et anticorps, validant ainsi l'immunogénicité des lipopeptides (Martinon et al., 1992). L'immunogénicité des lipopeptides est ensuite démontrée chez le macaque (Bourgault et al., 1994). Puis les chercheurs vont déterminer la molécule lipidique la plus adaptée à coupler aux peptides (groupement palmitoyl), ainsi que la position de la liaison souhaitable (C-terminale) (Deprez et al., 1996). La description de mutations d'échappement à la réponse CTL décrite au sein de la région centrale de la protéine Nef (Couillin et al., 1994) soulève le besoin d'inclure dans un vaccin CTL plusieurs épitopes reconnus par plusieurs molécules HLA différentes (donc plusieurs régions poly-épitopiques), et dans la mesure du possible dans des régions très conservées du VIH-1, afin d'éviter un échec du vaccin. Cette nécessité absolue de générer des CTL dirigés contre plusieurs épitopes différents est notamment démontrée après l'injection de 7 lipopeptides chez deux macaques infectés ensuite par voie intraveineuse avec un VIS. En effet, ces animaux qui ont induit des CTL dirigés contre seulement 1 seul épitope de Nef après vaccination, se sont avérés incapables de contrôler la réplication virale après l'infection, suite à l'apparition de mutations au sein de cet épitope (Mortara et al., 1998). De ce fait, les lipopeptides développés par l'ANRS pour être testés chez l'homme vont cibler différentes protéines du VIH-1 comme Env, Nef, Pol, Gag p17 et p24. Toutes les séquences choisies contiennent des clusters d'épitopes T CD8<sup>+</sup> (Gahery-Segard et al., 2003; Salmon-Céron et al., 2010) et l'étude de certains de ces fragments peptidiques comme ceux de la protéine Nef, montre qu'ils contiennent également de nombreux épitopes T CD4<sup>+</sup> (Gahery et al., 2007).

Les mécanismes d'apprêtement et de présentation des lipopeptides sont également étudiés. Il est notamment montré qu'après endocytose par les DC, les lipopeptides monopalmitoylés peuvent être dégradés par le protéasome mais également par la tripeptidyl peptidase II (Andrieu et al., 2003; Seifert et al., 2003), avant d'être présentés aux LT CD8<sup>+</sup> par la voie de présentation croisée (Andrieu et al., 2000; Hoeffel et al., 2007). De plus, il est également montré que de tels lipopeptides peuvent activer les DC par le TLR-2 (Zhu et al., 2004).

Plusieurs candidats vaccins lipopeptidiques sont testés chez l'homme, seuls ou en association avec d'autres types de candidats vaccins, dans des essais de vaccination prophylactique et thérapeutique de phase I et II menés par l'ANRS mais également par le « Vaccine Research Institute » (VRI) (Surenaud et al., 2017). Un de ces essais thérapeutiques, l'essai ANRS DALIA, utilise une technologie particulière : le « DC targeting » ou ciblage des cellules dendritiques (Lévy et al., 2014). Les réponses immunitaires T induites par ce vaccin seront particulièrement étudiées au cours de cette thèse.

### ***iii. La cellule dendritique : une cellule clé dans les stratégies vaccinales***

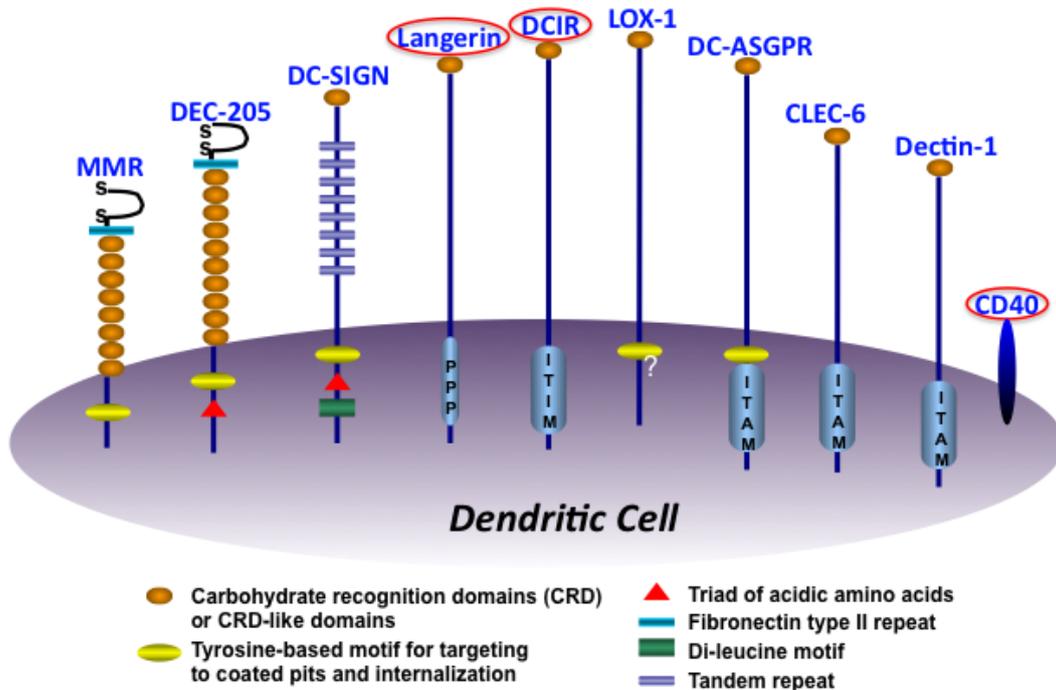
#### ***a. DC targeting ex vivo***

Devant la faible efficacité clinique des différents candidats vaccins « classiques » testés dans divers essais de vaccination thérapeutique contre le VIH-1 (Carcelain and Autran, 2013), et connaissant le rôle clé des cellules dendritiques dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, de nouvelles stratégies ayant pour but de cibler les DC se sont développées. Comme les DC sont présentes à faible fréquence dans l'organisme (0,5 à 2% des PBMC pour les DC et 2 à 3% des cellules épidermales pour les cellules de Langerhans), des protocoles visant à différencier *ex vivo* des monocytes en DC à l'aide de cocktails cytokiniques ont été mis au point. C'est à partir de ces protocoles que se sont développées les stratégies de « DC targeting » *ex vivo* consistant à prélever les monocytes de patients, les différencier *ex vivo* en DC, les charger avec l'antigène et les maturer avant de les réinjecter aux patients. Plusieurs essais utilisant cette technologie avec différents types d'antigènes du VIH-1 (protéines, peptides, lipopeptides, ALVAC, ARNm ou encore VIH autologue inactivé) ont été publiés, donnant des résultats encourageants (da Silva et al., 2018).

#### ***b. DC targeting in vivo***

La complexité du protocole du « DC targeting » *ex vivo* (aphérèses pour isoler les monocytes, culture des monocytes afin de les différencier en DC) rend cette stratégie difficilement généralisable à

l'ensemble des patients infectés par le VIH-1. Du coup, la communauté scientifique a cherché d'autres solutions pour cibler les DC *in vivo*. Une des solutions est l'utilisation d'anticorps couplés à un antigène d'intérêt. En effet, les DC expriment tout un arsenal de récepteurs pouvant permettre un ciblage spécifique de l'antigène d'intérêt sur ces cellules (**Figure 36**).



**Figure 36 : Les récepteurs des DC candidats pour le DC targeting**

Cette technologie, qui a l'avantage de pouvoir être utilisée aussi bien en vaccination thérapeutique qu'en vaccination prophylactique, est particulièrement développée par le VRI, et a déjà donné des résultats intéressants chez la souris humanisée (Cheng et al., 2018) ainsi que chez le macaque (Flamar et al., 2018). Elle va prochainement être testée chez l'homme dans le cadre d'essais cliniques.

Une autre solution envisagée afin de cibler les DC *in vivo* est l'injection de vaccin directement dans les ganglions lymphatiques (de Jong et al., 2019).

### 3. Les perspectives de guérison et d'éradication

Les vaccins thérapeutiques anti-VIH-1 utilisés seuls ont globalement montré un effet antiviral limité (réduction de la virémie plasmatique de l'ordre de 0,2-0,5 log, faible décalage du rebond viral pendant l'ATI). Le manque d'efficacité des vaccins thérapeutiques peut notamment être expliqué par

l'échappement rapide du virus à la réponse T CD8<sup>+</sup>, la présence de cellules T CD4<sup>+</sup> infectées de manière latente et donc invisibles pour les CTL, ou encore l'absence de restauration des fonctions des LT CD8<sup>+</sup> malgré un contrôle de la charge virale prolongé par la thérapie antirétrovirale. Il est donc maintenant généralement admis que les stratégies de guérison vont nécessiter des thérapies combinées (Pantaleo and Levy, 2016).

### ***i. L'éradication***

Concernant l'objectif difficilement réalisable de l'éradication du VIH-1, c'est-à-dire l'élimination de tout le VIH-1 contenu dans les réservoirs de l'organisme, quatre principales stratégies sont actuellement considérées.

La première est l'allogreffe de cellules souches CCR5Δ32, qui comme nous l'avons vu précédemment, est à ce jour la seule stratégie ayant fait ses preuves. Cependant cette stratégie n'est pas envisageable à grande échelle. De plus, le fait qu'il ait récemment été montré que la présence de cette délétion homozygote dans la population générale était associée à une diminution de l'espérance de vie (Wei and Nielsen, 2019), en réduisant la résistance à d'autres maladies infectieuses, pose la question du bénéfice/risque de cette stratégie.

La deuxième stratégie possible est la thérapie génique, une autre stratégie difficilement envisageable à l'heure actuelle.

L'utilisation d'agents de réversion de latence virale (« latency-reversing agent » ou LRA) constitue une troisième stratégie dans laquelle beaucoup d'espoirs sont fondés. En effet, différents agents comme les HDACi (inhibiteurs des histones désacétylases), les DNMTi (inhibiteurs des ADN méthyltransférases), les agonistes de la voie PKC-NFκB (« protein kinase C - nuclear factor kappa B ») ou encore les anticorps anti-ICB (« immune checkpoint blockers ») comme le Pembroluzimab (anticorps monoclonal anti-PD1) permettent une régulation positive de la transcription. Des stratégies de combinaisons de ces agents avec l'utilisation de vaccins thérapeutiques permettant de booster la réponse immunitaire contre le VIH-1, appelées « shock and kill », sont actuellement en cours d'évaluation (Perreau et al., 2017).

La dernière stratégie est d'identifier un marqueur spécifique des cellules constituant le réservoir du VIH-1 (Descours et al., 2017) afin de pouvoir les cibler par des toxines ou des drogues pour les éliminer (Perreau et al., 2017).

## *ii. La cure fonctionnelle ou rémission à long terme*

La cure fonctionnelle correspond au contrôle de la charge virale du VIH-1 sans traitement antirétroviral mais sans avoir éliminé tout le virus de l'organisme. Des rémissions à plus ou moins long terme ont déjà été observées chez des patients infectés par le VIH-1 traités en primo-infection et ayant ensuite arrêté leur traitement antirétroviral. C'est le cas du « Mississippi Child » ayant reçu une thérapie antirétrovirale 30 heures après sa naissance jusqu'à ses 18 mois et chez qui le rebond viral a été détecté dans le plasma 21,9 mois après avoir arrêté le traitement ([Luzuriaga et al., 2015](#)), ou encore celui des patients PTC (« post-treatment controllers ») dont nous avons déjà parlé. Ces patients, qui ont initié un traitement antirétroviral dans les 10 semaines suivant l'infection et l'ont suivi pendant plusieurs années avant de l'arrêter, contrôlent maintenant leur charge virale et sont étudiés depuis plusieurs années, notamment au sein de la cohorte VISCONTI ([Sáez-Cirión et al., 2013](#)).

Parmi les stratégies envisagées pour arriver à la cure fonctionnelle, on peut noter l'utilisation d'anticorps anti- $\alpha 4\beta 7$  (intégrine permettant la migration des LT CD4<sup>+</sup> vers les GALT) qui a montré chez des macaques infectés par un VIS puis mis sous ART des résultats très encourageants sur le contrôle de la charge virale après l'arrêt du traitement antirétroviral ([Byrareddy et al., 2016](#)).

Les anticorps neutralisants à large spectre sont également envisagés car de manière intéressante, un décalage sur la cinétique du rebond viral a été observé suite à l'utilisation de bNAbs chez des patients ayant arrêté leur traitement antirétroviral ([Mendoza et al., 2018](#); [Scheid et al., 2016](#)).

La communauté scientifique espère donc que l'association de vaccins thérapeutiques avec ces anticorps ou avec des immunomodulateurs tels que des cytokines (IL-7, IL-15), des « immune checkpoint inhibitors » (anti-PD1, anti-PDL1) ou encore des agonistes de TLR (agonistes de TLR3 et TLR7) pourront permettre un contrôle de la charge virale dans la durée et donc une rémission à long terme chez les patients infectés par le VIH-1 ([Seddiki and Lévy, 2018](#)). Récemment, une nouvelle stratégie nommée « block and lock » a vu le jour. Cette stratégie est basée sur l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine Tat, le dCA (« didehydro-Cortistatin A ») empêchant la transactivation de ce gène du VIH et donc l'activation de la transcription, ce qui empêche ainsi la réactivation du réservoir viral ([Kessing et al., 2017](#)).

Le **Tableau 6** montre différents essais cliniques terminés ou en cours visant à l'éradication ou la cure fonctionnelle du VIH-1.

Strategies	Mechanism of Action	Trial Design	Readouts	Clinical Trial
Anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 antibody: vedolizumab	Blocks the interaction between $\alpha$ 4 $\beta$ 7 and MADCAM-1	Phase I trial recruiting HIV-infected adults on ART	Plasma viremia following ATI	NCT02788175
TLR-9 agonist: MGN1703	May reactivate viral transcription in latently infected cells and enhance recognition of infected cells by effector cells	Phase 1b/2a trial recruiting chronically HIV-infected ART suppressed adults	HIV DNA, Plasma HIV RNA and CA-unsplliced HIV RNA	NCT02443935
TLR-7 agonist: GS-9620	May reactivate viral transcription in latently infected cells and enhance recognition of infected cells by effector cells	Phase I trial recruiting HIV-infected ART suppressed adults	Plasma HIV RNA	NCT02858401
Anti-PDL1: BMS-936559	Augments adaptive immune effector functions, enhances T cell functions	Phase I study recruiting HIV-1 infected individuals on suppressive ART	HIV-1 RNA by SCA	NCT02028403
3BNC117 bNab	Potential effect on the size of the reservoir by ADCC and CDC	Phase 2 study recruiting HIV-infected individuals on suppressive ART	Rate of viral rebound post ATI	NCT02446847
VRC07 bNab	Potential effect on the size of the reservoir by ADCC and CDC	Phase I study recruiting individuals with chronic HIV infection	Plasma viral rebound following ATI	NCT02471326
Romidepsin and 3BNC117	May enhance HIV transcription in latently infected cells and bNAbs may impact latent HIV-1 reservoir size	Phase 2 trial recruiting treatment naive HIV-1 individuals initiating ART	Plasma HIV RNA kinetics and HIV DNA levels post ATI	NCT03041012
Panobinostat and PEG-IFN- $\alpha$ 2a	May enhance HIV transcription in latently infected cells; may suppress HIV replication and decrease HIV-1 integration	Phase I/II pilot study recruiting HIV-infected ART-treated individuals	Change in CD4 <sup>+</sup> T cell HIV-1 DNA levels	NCT02471430
Vorinostat and AGS-004 therapeutic vaccination	May enhance HIV transcription in latently infected cells; AGS-004 boosts HIV-specific immune responses	Phase I recruiting HIV-infected ART-treated individuals	Change in HIV infection frequency per million resting CD4 <sup>+</sup> T cells	NCT02707900
Romidepsin and HIVconsv vaccination (BCN02-Romi)	May enhance HIV transcription in latently infected cells; combined with immunogenic HIVconsv vaccine in early treated individuals	Phase I recruiting early ART treated HIV-infected individuals	Plasma viral rebound kinetics following ATI	NCT02616874

**Tableau 6 : Essais cliniques visant à l'éradication ou la cure fonctionnelle du VIH-1**

*D'après Perreau et al., 2017. ADCC, antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; ART, antiretroviral therapy; ATI, analytical treatment interruption; CA, cell-associated; CDC, complement-dependent cytotoxicity; GIT, gastrointestinal tract; HDACi, histone deacetylase inhibitor; HEV, high endothelial venule; LRA, latency-reversing agent; MADCAM-1, mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1; SCA, single copy assay; TLR, Toll-like receptor.*

# **Objectifs des travaux**

L'objectif de cette thèse était de comparer les réponses T induites par des vaccins prophylactiques ou thérapeutiques anti-VIH-1, et notamment de déterminer l'impact sur l'immunodominance des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de différentes stratégies vaccinales utilisant des lipopeptides seuls ou associés avec d'autres candidats vaccins comme de l'ADN, de l'ALVAC, du MVA, ou encore des cellules dendritiques chargées avec des lipopeptides.

Les travaux se sont divisés en 5 parties :

Le **premier objectif** était de comparer les réponses T (détectées par technique ELISpot IFN $\gamma$  après stimulation de PBMC par des pools de peptides 15-mers) induites lors de différents essais de vaccination prophylactique (ANRS VRI 01) et thérapeutique (ANRS 093, DALIA et LIGHT) anti-VIH-1 utilisant des lipopeptides seuls ou associés avec d'autres candidats vaccins. Le but de ce premier objectif était de mettre en évidence des éventuelles différences concernant la fréquence de sujets répondeurs ainsi que les principales régions vaccinales ciblées par les LT des volontaires sains et des patients vaccinés dans ces différents essais cliniques, et déterminer alors si un candidat vaccin ou un schéma vaccinal était supérieur aux autres. Comme les résultats ELISpot IFN $\gamma$  de l'essai DALIA (essai de vaccination avec des DC chargées *ex vivo* avec des lipopeptides) se sont avérés très intéressants, nous avons ensuite décidé d'aller plus loin dans l'étude des réponses observées dans cet essai.

Pour le **deuxième objectif**, je me suis donc intéressé particulièrement à l'identification et la caractérisation des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> anti-VIH-1 observées après vaccination dans l'essai thérapeutique DALIA. Le but de ce deuxième objectif était de déterminer le profil cytokinique des réponses, de rechercher une éventuelle corrélation avec la charge virale mesurée après l'arrêt de traitement antirétroviral (phase d'ATI), mais également de réaliser une cartographie des épitopes ciblés par les LT spécifiques du VIH-1 des patients participants à cet essai.

Après avoir observé une corrélation inverse entre l'étendue et l'intensité de la réponse IL-13 après vaccination et la valeur maximale de charge virale pendant la phase d'ATI lors de l'essai ANRS DALIA, nous avons décidé de quantifier les cellules T sécrétrices d'IL-13 après vaccination par technique ELISpot (après stimulation de PBMC par des pools de peptides 15-mers) dans plusieurs essais vaccinaux anti-VIH-1. Pour ce **troisième objectif**, nous avons utilisé des PBMC congelées provenant de volontaires sains ou de patients séropositifs pour le VIH-1 ayant participé à des essais cliniques utilisant des lipopeptides seuls (LIPATHERA et ANRS VAC 18); associés avec d'autres candidats vaccins comme de l'ADN (ANRS VRI 01 et LIGHT), de l'ALVAC (ANRS 093), du MVA (ANRS VRI 01) ; ou encore des cellules dendritiques chargées avec des lipopeptides (ANRS DALIA) ou avec du VIH-1 autologue (DCV2/MANON07-ORVACS). Le but de ce troisième objectif était de déterminer si l'IL-13 pouvait être

considérée comme un marqueur du contrôle de la réplication du VIH-1 et si la quantité de LT spécifiques du VIH-1 sécrétant de l'IL-13 était dépendante du type de vaccination, du schéma vaccinal ou encore de la dose de vaccin utilisée.

Après avoir identifié les épitopes optimaux ciblés par les LT CD8<sup>+</sup> des patients de l'essai DALIA, nous avons pu également lors d'un **quatrième objectif** comparer ces épitopes avec ceux identifiés dans l'essai prophylactique ANRS VAC 04 et les essais thérapeutiques LIPATHERA et ANRS 093. Le but de ce quatrième objectif était notamment d'évaluer si l'immunodominance des réponses T CD8<sup>+</sup> anti-VIH-1 pouvait varier entre des patients séropositifs pour le VIH-1 et des volontaires sains vaccinés par des candidats vaccins contenant en partie des lipopeptides similaires.

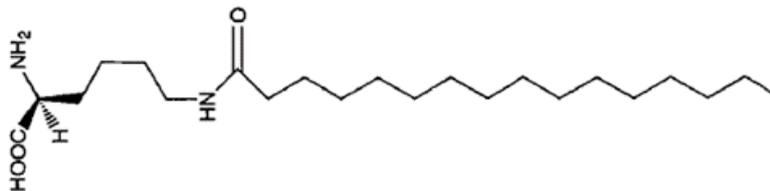
Enfin, la caractérisation des réponses T CD4<sup>+</sup> observées après vaccination chez les patients de l'essai DALIA nous a permis dans un **cinquième objectif** de comparer ces réponses avec celles retrouvées dans les essais prophylactiques ANRS VAC 04 et VAC 18 et les essais thérapeutiques LIPATHERA et ANRS 093. Le but de ce cinquième et dernier objectif était ainsi d'évaluer si l'immunodominance des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-VIH-1 pouvait varier suivant le type de vaccin utilisé et la population ciblée.

# **Matériel et méthodes**

## I. Description des différents candidats testés dans les essais vaccinaux analysés dans cette thèse

### 1. LIPO-6

LIPO-6 est le premier candidat vaccin lipopeptidique qui a été testé dans un essai clinique en France. Il est le fruit d'une longue collaboration entre chimistes et biologistes. Ce vaccin, dont une caractérisation détaillée a été publiée (Klinguer et al., 2000), consiste en un mélange de 6 peptides provenant des protéines Gag, Nef et Env du VIH-1 (séquences de la souche LAI du sous-type B pour Gag et Nef, et de la souche BX08 du sous-type B pour Env) contenant de multiples épitopes CTL (Tableau 7). Chaque séquence peptidique a été modifiée par l'ajout en position C-terminale d'un groupe N- $\epsilon$ -palmitoyl-lysylamide (acide palmitique) (Figure 37).



**Figure 37 : Représentation schématique de la partie lipidique ( $N^{\epsilon}$ -palmitoyl-L-lysine) des vaccins LIPO-6 / LIPO-5 / LIPO-6T**

### 2. LIPO-5

Le vaccin LIPO-5 est basé sur le même principe que LIPO-6, la différence entre les 2 vaccins étant le nombre de lipopeptides et les séquences utilisées. En effet, suite aux résultats des premiers essais vaccinaux utilisant LIPO-6, des modifications dans le choix des séquences ont été effectuées dans le but d'augmenter l'immunogénicité du vaccin (Tableau 7).

### 3. LIPO-6T

Le vaccin LIPO-6T est constitué du mélange des 5 lipopeptides de LIPO-5 avec un sixième lipopeptide dont la séquence provient de l'anatoxine tétanique et qui contient un épitope T CD4<sup>+</sup> dit « promiscuous » ou universel (pouvant se lier à un grand nombre de molécules HLA de classe II différentes et pouvant donc potentiellement être reconnu par les LT CD4<sup>+</sup> d'un grand nombre de personnes) (Tableau 7).

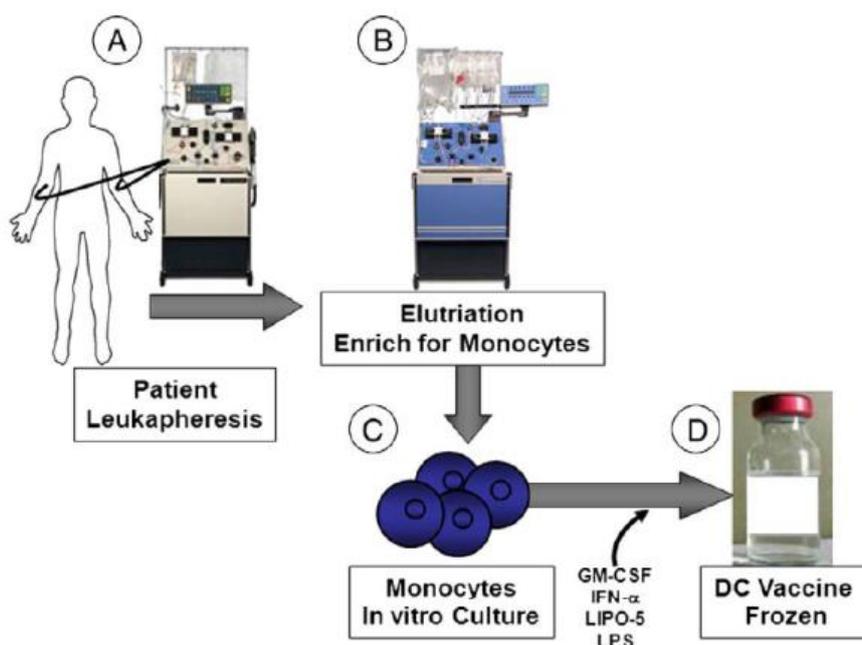
Lipoptides	LIPO-6	LIPO-5	LIPO-6T
Gag 17-35		EKIRLRPGGKKKYKLVHIV K(Palm)-NH <sub>2</sub>	EKIRLRPGGKKKYKLVHIV K(Palm)-NH <sub>2</sub>
Gag 183-214	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDR K(Palm)-NH <sub>2</sub>		
Gag 253-284	NPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPSILD K(Palm)-NH <sub>2</sub>	NPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPSILD K(Palm)-NH <sub>2</sub>	NPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPSILD K(Palm)-NH <sub>2</sub>
Nef 66-97	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGGL K(Palm)-NH <sub>2</sub>	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGGL K(Palm)-NH <sub>2</sub>	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGGL K(Palm)-NH <sub>2</sub>
Nef 116-145 <sup>a</sup>		HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Palm)-NH <sub>2</sub>	HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL K(Palm)-NH <sub>2</sub>
Nef 117-147	TQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKLVP K(Palm)-NH <sub>2</sub>		
Nef 182-205	EWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKN K(Palm)-NH <sub>2</sub>		
Pol 325-355		AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDLIV K(Palm)-NH <sub>2</sub>	AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDLIV K(Palm)-NH <sub>2</sub>
Env 303-335	TRPNNTRKSIHIGPGRFYATGEIIGDIRQAHK K(Palm)-NH <sub>2</sub>		
TT 830-846 <sup>b</sup>			Ac-QYIKANSKFIGITELKK K(Palm)-NH <sub>2</sub>

**Tableau 7 : Description des séquences peptidiques de LIPO-6 / LIPO-5 / LIPO-6T**

<sup>a</sup>la cystéine normalement présente en position 142 de la séquence HIV-1<sub>LAI</sub> a été remplacée par une lysine pour des raisons de stabilité du lipopeptide. <sup>b</sup>la séquence 830-846 a été préférée à celle de l'épitope optimal 830-843 pour des raisons de solubilité. De plus, ce lipopeptide a été synthétisé avec une modification à l'extrémité N-terminale par l'ajout d'un groupe acétyle pour des raisons de stabilité du lipopeptide

#### 4. « LIPO-5-loaded DC »

Le vaccin « LIPO-5-loaded DC » est un vaccin individualisé constitué de monocytes du patient dérivés *ex vivo* en cellules dendritiques, activées avec de l'IFN $\alpha$ , chargées avec LIPO-5 et maturées avec du LPS (lipopolysaccharide) (**Figure 38**). Le procédé de production détaillé a été publié ([Cobb et al., 2011](#)).

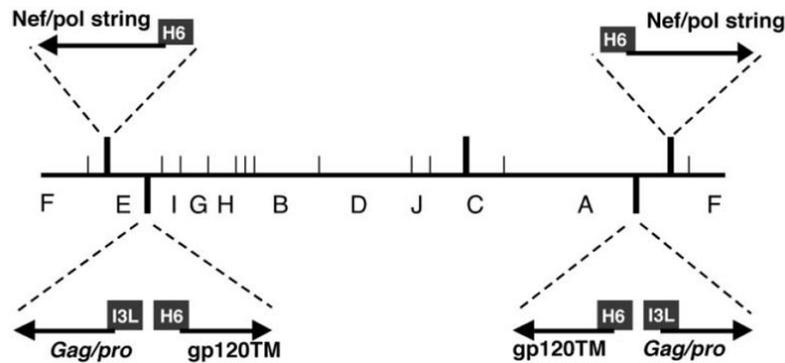


**Figure 38 : Représentation schématique de la production du vaccin « LIPO-5-loaded DC »**

**A.** Récupération des PBMC par leucaphérèse. **B.** Le contenu de la leucaphérèse est ensuite séparé par la taille et la densité cellulaire. **C.** Les monocytes enrichis sont cultivés avec du GM-CSF (« granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ») (100ng/ml) et de l'IFN $\alpha$  (500UI/ml), chargées avec LIPO-5 (0,1 $\mu$ M) et maturées par du LPS (5EU/ml). **D.** Les DC sont récupérées, lavées puis congelées dans une solution contenant 80% de sérum autologue inactivé, 10% de Plasma-Lyte A supplémenté avec 5% de dextrose, et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO).

### 5. vCP1433

Le vCP1433 est un ALVAC (dérivé du virus canarypox) exprimant la protéine Env gp120 (sous-type B, souche MN) associée à la portion transmembranaire de gp41 (sous-type B, souche LAI), les protéines Gag (sous-type B, souche LAI) et Protéase (sous-type B, souche LAI) ainsi qu'un polypeptide contenant plusieurs épitopes CTL des protéines Nef et Pol du VIH-1 (**Figure 39**).

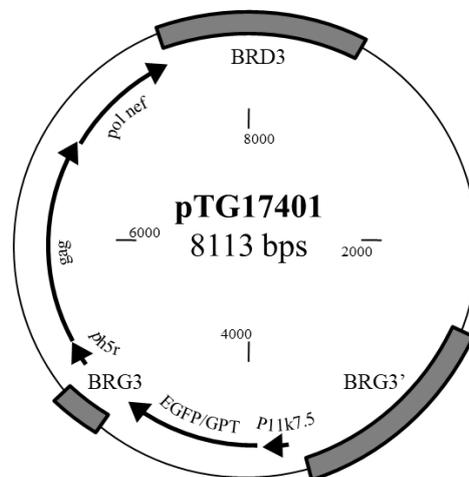


**Figure 39 : Carte génomique du vCP1433**

L'insertion des gènes du VIH-1 est représentée sur la carte de restriction de l'enzyme *XhoI* du génome de l'ALVAC. Les promoteurs du poxvirus sont représentés dans les carrés gris et les flèches indiquent l'orientation de la transcription.

### 6. MVA HIV-B

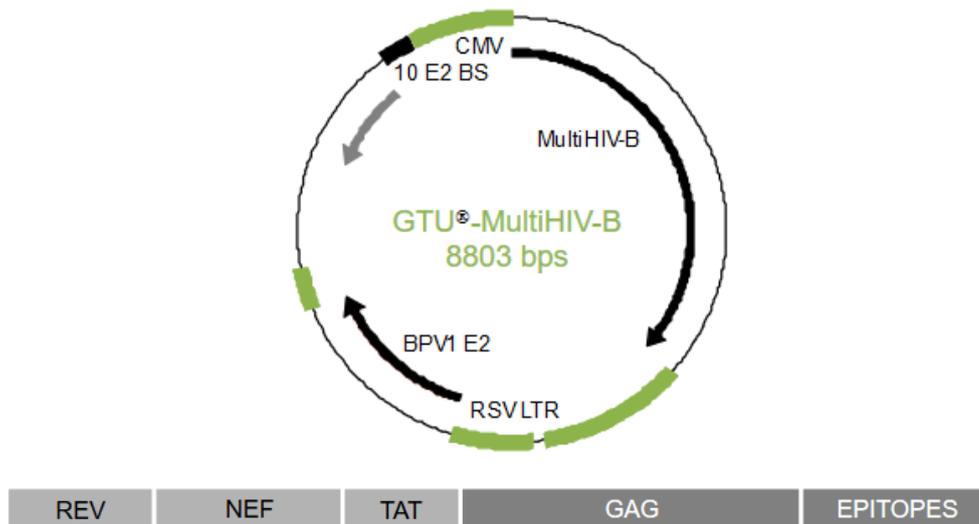
Le MVA HIV-B est un MVA (« modified vaccinia ankara », poxvirus atténué) au sein duquel est intégré la séquence intégrale optimisée par codon de Gag (séquence d'acides aminés (aa) 1-512) fusionnée avec des fragments de Pol (aa : 172-219 ; 325-383 ; 461-519) et Nef (aa : 66-147 ; 182-206) de l'isolat Bru/Lai du sous-type B du VIH-1 (Los Alamos, numéro de dépôt K02013). Ces séquences sont identiques à celles de la protéine Gag et du polypeptide Nef/Pol contenues dans le vCP1433 (**Figure 40**).



**Figure 40 : Représentation schématique du MVA HIV-B**

## 7. GTU-MultiHIV-B

Le GTU-MultiHIV-B est un ADN circulaire codant pour un antigène MultiHIV (protéine de fusion synthétique constituée par des polypeptides de pleine longueur de Rev, Nef, Tat, Gag p17 et p24, ainsi que onze régions de 17 à 45 acides aminés contenant plus de 20 épitopes Th et CTL au sein des régions de la protéase (PR), de la transcriptase inverse (RT) et de la gp160 du VIH-1 (souche HAN2 du sous-type B) (**Figure 41**).



**Figure 41 : Représentation schématique du GTU-MultiHIV-B**

## II. Description des différents essais vaccinaux anti-VIH-1 analysés dans cette thèse

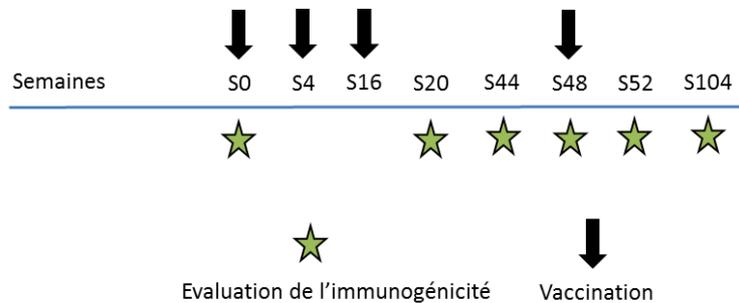
Pour les différents objectifs réalisés au cours de cette thèse, j'ai utilisé les échantillons (ou les résultats) de différents essais cliniques (**Tableau 8**).

### 1. Les essais prophylactiques

#### Essai ANRS VAC 04

L'essai ANRS VAC 04 est le premier essai clinique de phase I de l'ANRS testant un vaccin prophylactique anti-VIH-1 à base de lipopeptides. Le vaccin utilisé dans cet essai est le LIPO-6. Ce vaccin a été injecté par voie intramusculaire à différentes doses (100µg, 250µg et 500µg) avec ou sans adjuvant QS-21 (saponine extraite de l'écorce de l'arbre *Quillaja saponaria*) à la semaine (S)0, S4 et S16 chez 28 volontaires sains (**Figure 42**), et a induit de fortes réponses B et T détectées 4

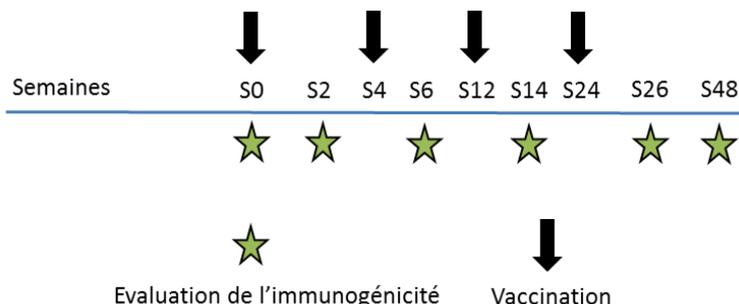
semaines après la 3<sup>ème</sup> immunisation (Gahery-Segard et al., 2000; Pialoux et al., 2001). Un mois après une 4<sup>ème</sup> injection vaccinale réalisée à S48, des réponses B et T anti-VIH-1 étaient détectées chez plus de 85% des vaccinés. Un an après ce boost, ces réponses étaient encore présentes chez plus de 50% des vaccinés (Gahery-Segard et al., 2003). De plus, la quatrième injection de lipopeptide a permis une augmentation de l'étendue des réponses T CD8<sup>+</sup>.



**Figure 42 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS VAC 04**

Essai ANRS VAC 18

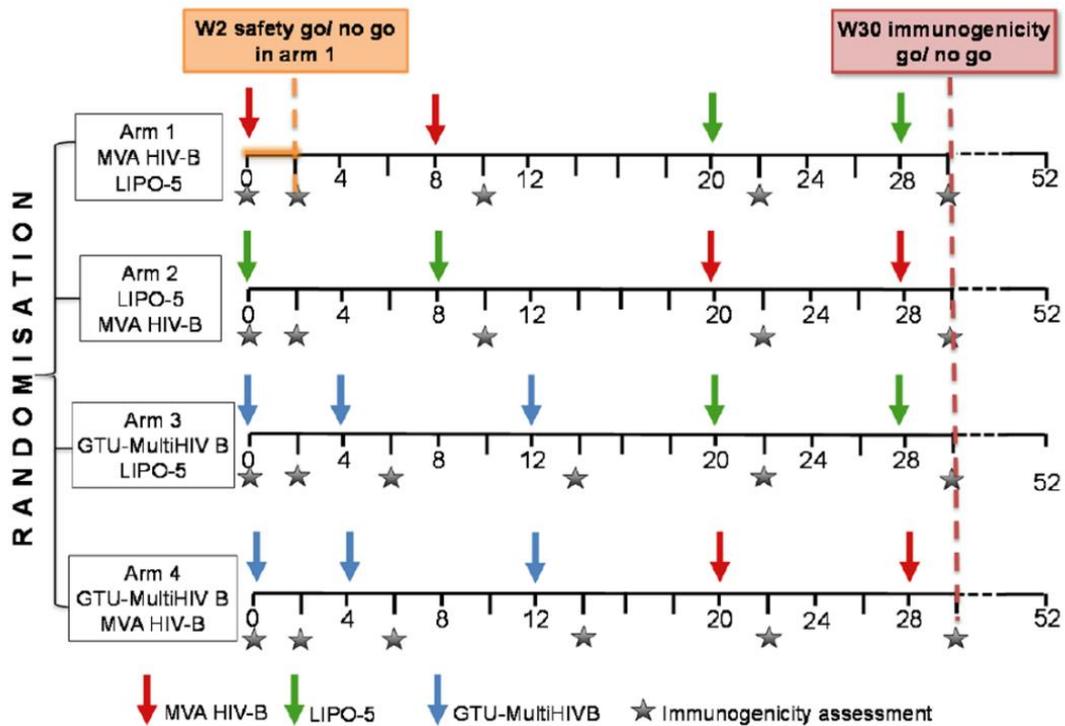
L'essai ANRS VAC 18 est un essai de phase II visant à comparer l'innocuité et l'immunogénicité de 3 doses de vaccin LIPO-5 (50µg, 150µg et 500µg de chacun des lipopeptides) administrées par voie intramusculaire chez des volontaires sains. Ce vaccin a été injecté à S0, S4, S12 et S24 chez 132 volontaires sains, et l'immunogénicité a été évaluée 2 semaines après chaque injection vaccinale (Figure 43). Plus de 60% des volontaires vaccinés ont développé une réponse T CD8<sup>+</sup> soutenue (observée au moins à 2 occasions entre S0 et S26) détectée par technique ELISpot IFN $\gamma$  après amplification des cellules mémoires, et 40% des volontaires présentaient une réponse proliférative (T CD4<sup>+</sup>) cumulative jusqu'à S26 (Salmon-Céron et al., 2010). La région Gag 253-284 a été identifiée comme la plus immunogène aussi bien pour les réponses T CD8<sup>+</sup> que CD4<sup>+</sup>. De plus, des réponses cytokiniques Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) et Th2 (IL-5, IL-13) ont également été observées dans cet essai (Richert et al., 2013).



**Figure 43 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS VAC 18**

Essai ANRS VRI 01

L'essai VRI 01 est un essai de phase I/II utilisant 3 différents candidats vaccins : LIPO-5, MVA HIV-B et GTU-MultiHIV-B. Ces 3 candidats vaccins sont combinés en 4 stratégies différentes (**Figure 44**). Tous les vaccins ont été injectés par voie intramusculaire chez 92 volontaires sains. Les résultats de cet essai ne sont pas encore publiés mais ont été présentés au congrès HIVR4P à Madrid en 2018 (Richert et al., 2018).



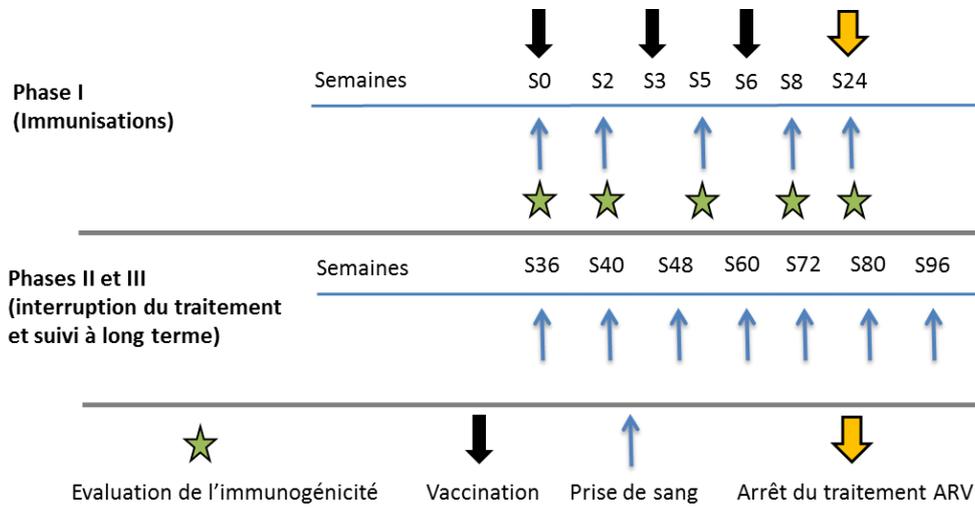
**Figure 44 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS VRI 01**

## 2. Les essais thérapeutiques

### Essai LIPATHERA

L'essai LIPATHERA est un essai clinique de phase II testant le vaccin LIPO-6 chez des patients séropositifs pour le VIH-1. Dans cet essai de vaccination thérapeutique, 24 patients sous traitement antirétroviral ont été immunisés à S0, S3 et S6 avec 500µg de chaque lipopeptide par voie intramusculaire (**Figure 45**). Une phase d'arrêt du traitement antirétroviral (ATI) a été effectuée pour évaluer l'efficacité de la vaccination thérapeutique. Cette étude a montré tout d'abord que la vaccination pouvait permettre l'induction de nouvelles réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez des patients VIH+ (Gahery et al., 2006). De plus, à la fin de la période d'ATI (S96, soit 72 semaines après l'arrêt du

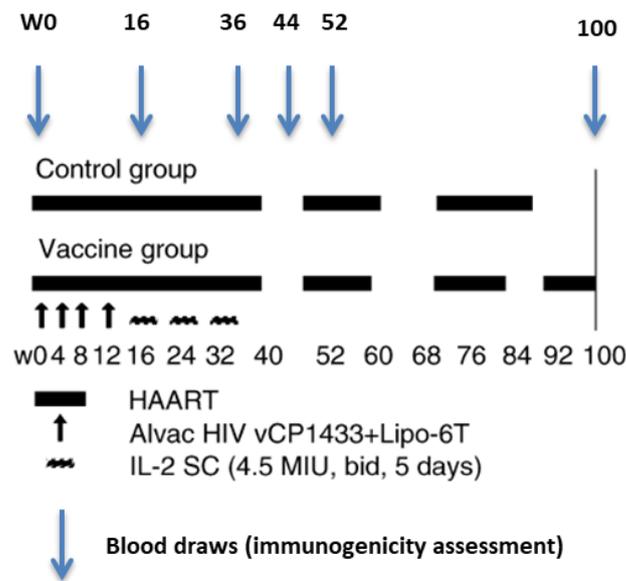
traitement antirétroviral) 38% des patients vaccinés n’avaient toujours pas repris leur traitement antirétroviral (Pialoux et al., 2008b).



**Figure 45 : Schéma vaccinal de l'essai LIPATHERA**

### Essai ANRS 093

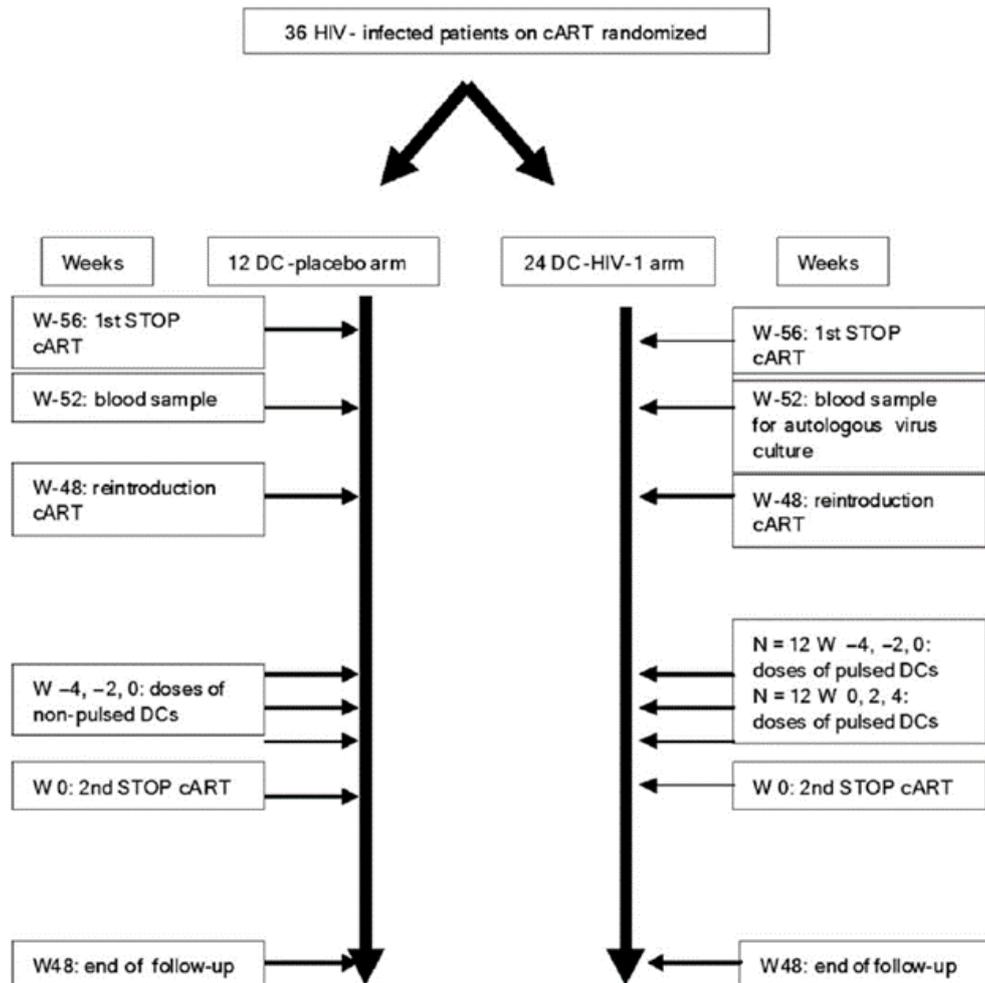
L'essai ANRS 093 est un essai clinique de phase II testant le candidat vaccin LIPO-6T. De plus, le protocole vaccinal comportait une série de 3 cures d'IL-2 recombinante après les vaccinations. Des périodes d'interruption de traitement antirétroviral structurées (STI) étaient également prévues pour évaluer l'efficacité de la vaccination thérapeutique. Cet essai a inclus 71 patients divisés entre le groupe vacciné recevant 4 injections intramusculaires de LIPO-6T (à S0, S4, S8 et S12) suivies de 3 cures d'IL-2 (injectée par voie sous-cutanée) et le groupe placebo (**Figure 46**). Juste après vaccination (avant les cures d'IL-2), 68% des vaccinés contre 26% des placébos ont induit de nouvelles réponses prolifératives T CD4<sup>+</sup> (Levy et al., 2005). Un suivi à long terme des patients a permis de montrer que les réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> étaient corrélées avec le pourcentage de temps passé sans traitement antirétroviral pendant les phases de STI (Levy et al., 2006).



**Figure 46 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS 093**

#### Essai DCV-2 / MANON07 ORVACS

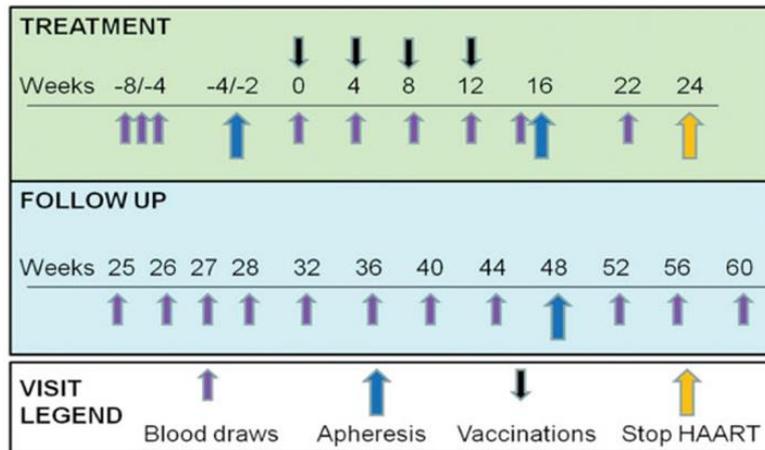
L'essai Clinique DCV-2 est un essai de phase II testant chez des patients VIH+ sous traitement antirétroviral un vaccin composé de cellules dendritiques dérivées de monocytes autologues, chargées avec du VIH autologue inactivé par la chaleur, et maturées avec un cocktail cytokinique comprenant de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, du TNF $\alpha$ , de la prostaglandine E<sub>2</sub>, du GM-CSF et de l'IL-4 (García et al., 2011). Un bras placebo composé de 12 patients recevant les cellules dendritiques non chargées à S-4, S-2 et S0 a été inclus. Les vaccinés ont quant à eux été scindés en 2 groupes : l'un recevant les injections par voies sous-cutanée et intradermique à S-4, S-2 et S0 et l'autre recevant ces mêmes injections à S0, S2 et S4 (S0 correspondant à la date d'arrêt du traitement antirétroviral) (Figure 47). A S12, 55% des vaccinés (2 groupes cumulés) présentaient une baisse supérieure ou égale à 1 log<sub>10</sub> de la charge virale plasmatique associée avec une augmentation des réponses T spécifiques du VIH-1 (García et al., 2013). De plus, les réponses T spécifiques du VIH-1 mesurées le jour de la troisième injection vaccinale étaient inversement corrélées avec les niveaux d'ADN totaux et intégrés du VIH-1 après interruption de traitement antirétroviral chez les vaccinés (Andres et al., 2015).



**Figure 47 : Schéma vaccinal de l'essai DCV-2 / MANON07 ORVACS**

#### Essai ANRS DALIA

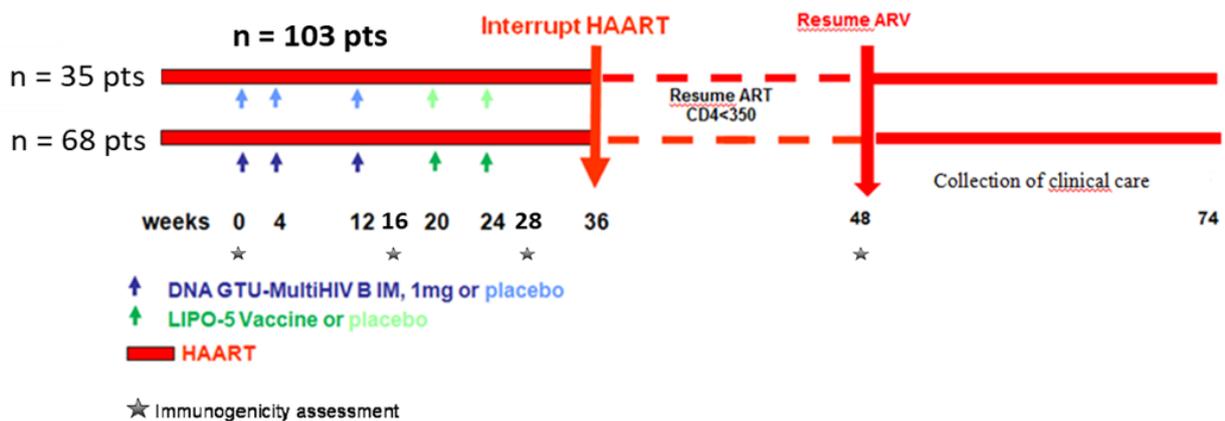
L'essai de vaccination thérapeutique ANRS DALIA, dont les promoteurs étaient l'INSERM et le BIIR (Baylor Institute for Immunology Research, Dallas), est un essai clinique de phase I qui a été réalisé chez 19 patients séropositifs pour le VIH-1 sous traitement antirétroviral. Ces patients ont reçu 4 injections (à S0, S4, S8 et S12) sous-cutanées de leurs propres monocytes dérivés *ex vivo* en cellules dendritiques, chargées avec LIPO-5, activées avec de l'IFN $\alpha$ , et maturées avec du LPS. Une phase d'ATI a ensuite été réalisée afin d'évaluer l'efficacité du vaccin sur le rebond viral (**Figure 48**). La première publication concernant cet essai a montré que 50% des patients présentaient une baisse d'1 log<sub>10</sub> de la charge virale maximale observée lors de l'ATI et qu'une corrélation inverse était retrouvée entre la valeur de charge virale maximale et la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> polyfonctionnels ainsi que la production d'IL-2, d'IFN $\gamma$ , d'IL-21 et d'IL-13 après vaccination (Lévy et al., 2014).



**Figure 48 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS DALIA**

Essai ANRS LIGHT

L'essai clinique de phase II ANRS LIGHT évaluait comme stratégie vaccinale le LIPO-5 en « boost » après un « prime » réalisé avec le vaccin ADN GTU-MultiHIV-B. Dans cet essai de vaccination thérapeutique anti-VIH-1, 105 patients VIH+ sous traitement antirétroviral ont reçu 3 injections intramusculaires de vaccin ADN (S0, S4 et S12) suivies de deux injections intramusculaires de LIPO-5 (S20 et S24). Le traitement antirétroviral a ensuite été arrêté entre S36 et S48 (**Figure 49**). Les résultats de cet essai ne sont pas encore publiés mais ont été présentés au congrès HIVR4P à Madrid en 2018 (Lacabaratz et al., 2018).



**Figure 49 : Schéma vaccinal de l'essai ANRS LIGHT**

Essai clinique	Type de vaccin	Phase	Promoteur	Date	Nombre de sujets	Vaccin (voie d'immunisation)	Schéma vaccinal	Adjuvant ou Immunothérapie associée	Références
<b>VAC 04</b>	Prophylactique	I	ANRS	1996-2000	28 (6 groupes)	LIPO-6 (IM)	4 x LIPO-6 (100µg) 4 x LIPO-6 (100µg) 4 x LIPO-6 (250µg) 4 x LIPO-6 (250µg) 4 x LIPO-6 (500µg) 4 x LIPO-6 (500µg)	- QS-21 - QS-21 - QS-21	Gahéry-Ségard et al., 2000 Pialoux et al., 2001 Gahéry-Ségard et al., 2003
<b>VAC 18</b>	Prophylactique	II	ANRS	2004-2008	132 (4 groupes)	LIPO-5 (IM)	4 x LIPO-5 (50µg) 4 x LIPO-5 (150µg) 4 x LIPO-5 (500µg) Placebo (diluant)	- - - -	Salmon-Céron et al., 2010 Richert et al., 2013
<b>VRI 01</b>	Prophylactique	I/II	INSERM ANRS	2014-2016	92 (4 groupes)	LIPO-5 (IM) MVA-HIV B (IM) GTU-Multi HIV B (IM)	2 x MVA / 2 x LIPO-5 2 x LIPO-5 / 2 x MVA 3 x GTU / 2 x LIPO-5 3 x GTU / 2 x MVA	- - - -	Richert et al., 2018 (Communication orale HIVR4P 2018, Madrid)
<b>LIP THERA</b>	Thérapeutique	II	ARVIH	2000-2005	24	LIPO-6 (IM)	3 x LIPO-6 (500µg)	-	Gahéry et al., 2006 Pialoux et al., 2008
<b>ANRS 093</b>	Thérapeutique	II	ANRS	2000-2003	71 (2 groupes)	LIPO-6T (IM) vCP1433 (IM)	4 x (LIPO-6T + vCP1433) Placebo (diluant)	3 x IL2 -	Lévy et al., 2005 Lévy et al., 2006
<b>DCV-2 MANON07</b>	Thérapeutique	II	Hospital Clinic de Barcelone	2006-2011	36 (2 groupes)	VIH-1 autologue inactivé chargé sur Mo-DC des patients activées par cytokines (SC et ID)	3 injections	- -	Garcia et al., 2011 Garcia et al., 2013 Andrés et al., 2015
<b>DALIA 1</b>	Thérapeutique	I	BIIR INSERM ANRS	2008-2011	19	LIPO-5 chargé sur Mo-DC des patients activées par LPS (SC)	4 injections	-	Lévy et al., 2014
<b>ANRS 149 LIGHT VRI 02</b>	Thérapeutique	II	INSERM ANRS	2013-2016	105 (2 groupes)	LIPO-5 (IM) GTU-Multi HIV B (IM)	3 x GTU / 2 x LIPO-5 Placebo (diluant)	- -	Lacabaratz et al., 2018 (Communication orale HIVR4P 2018, Madrid)

**Tableau 8 : Description des différents essais cliniques analysés au cours de cette thèse**

### III. Peptides utilisés pour la réalisation des tests immunologiques

Différents tests immunologiques : ELISpot (« enzyme-linked immunospot »), Luminex, ICS (« intracellular cytokine staining ») ont été réalisés au cours de cette thèse afin d'évaluer les réponses immunitaires des individus vaccinés et d'identifier les épitopes reconnus par les LT de ces patients. Tous ces tests sont des tests classiques dont le principe a déjà été publié à de nombreuses reprises ou dont le protocole est détaillé dans notre article qui vient d'être publié dans PLOS Pathogens (cf p. 139-140). Un des éléments important pour la réalisation de ces différents tests immunologiques est l'antigène utilisé. Concernant les peptides 15-mers utilisés pour l'immunomonitoring des différents essais vaccinaux dont je parle dans cette thèse, il faut savoir que les pools de peptides 15-mers utilisés n'ont pas toujours été identiques. En effet, même si certaines séquences de LIPO-5 sont présentes dans les vaccins utilisés dans tous ces essais, certains candidats vaccins associés ont parfois des séquences provenant de protéines différentes du VIH-1.

De ce fait, l'immunogénicité des essais ANRS 093 et DALIA a été évaluée par des tests ELISpot IFN $\gamma$  à l'aide de 18 pools de peptides 15-mers chevauchant de 11 acides aminés provenant de la société NéoMPS et couvrant les régions des protéines Gag, Pol et Nef contenues dans les vaccins utilisés dans ces essais (LIPO-6T, vCP1433 et LIPO-5). Par contre, l'immunogénicité des essais ANRS LIGHT et VRI 01 a été évaluée par des tests ELISpot IFN $\gamma$  à l'aide de 15 pools de peptides 15-mers chevauchant de 11 acides aminés provenant de la société JPT et couvrant les régions des protéines Gag, Pol, Nef, Rev, Tat et Env contenues dans les vaccins utilisés dans ces essais (LIPO-5, MVA HIV-B et GTU-MultiHIV-B). Afin de pouvoir évaluer au mieux les réponses induites dans les protocoles vaccinaux LIGHT et VRI 01, j'ai réalisé un nouveau design des pools de peptides JPT permettant d'identifier directement le candidat vaccin reçu en fonction du pool de peptides induisant la réponse. Ces différents pools de peptides ainsi que les séquences vaccinales des 3 derniers candidats vaccins cités ci-dessus sont représentés en **Figure 50**.

L'identification des cellules induisant une réponse cytokinique post-vaccinale dans l'essai DALIA ainsi que la caractérisation de ces réponses a été réalisée avec des tests Luminex et ICS à l'aide de peptides 15-mers individuels et de peptides optimaux 8-10-mers (détails précisés dans le matériel et méthodes de l'article publié dans PLOS Pathogens).

Pour quantifier les cellules sécrétrices d'IL-13 au sein des différents essais étudiés, j'ai réalisé des tests ELISpot à l'aide de 4 maxi pools de peptides 15-mers provenant de JPT : 1 pool Gag contenant les pools p17 + p24 + p2p6, 1 pool Pol/Env, 1 pool Nef, et 1 pool Rev/Tat (**Figure 50**).

Matériel et méthodes

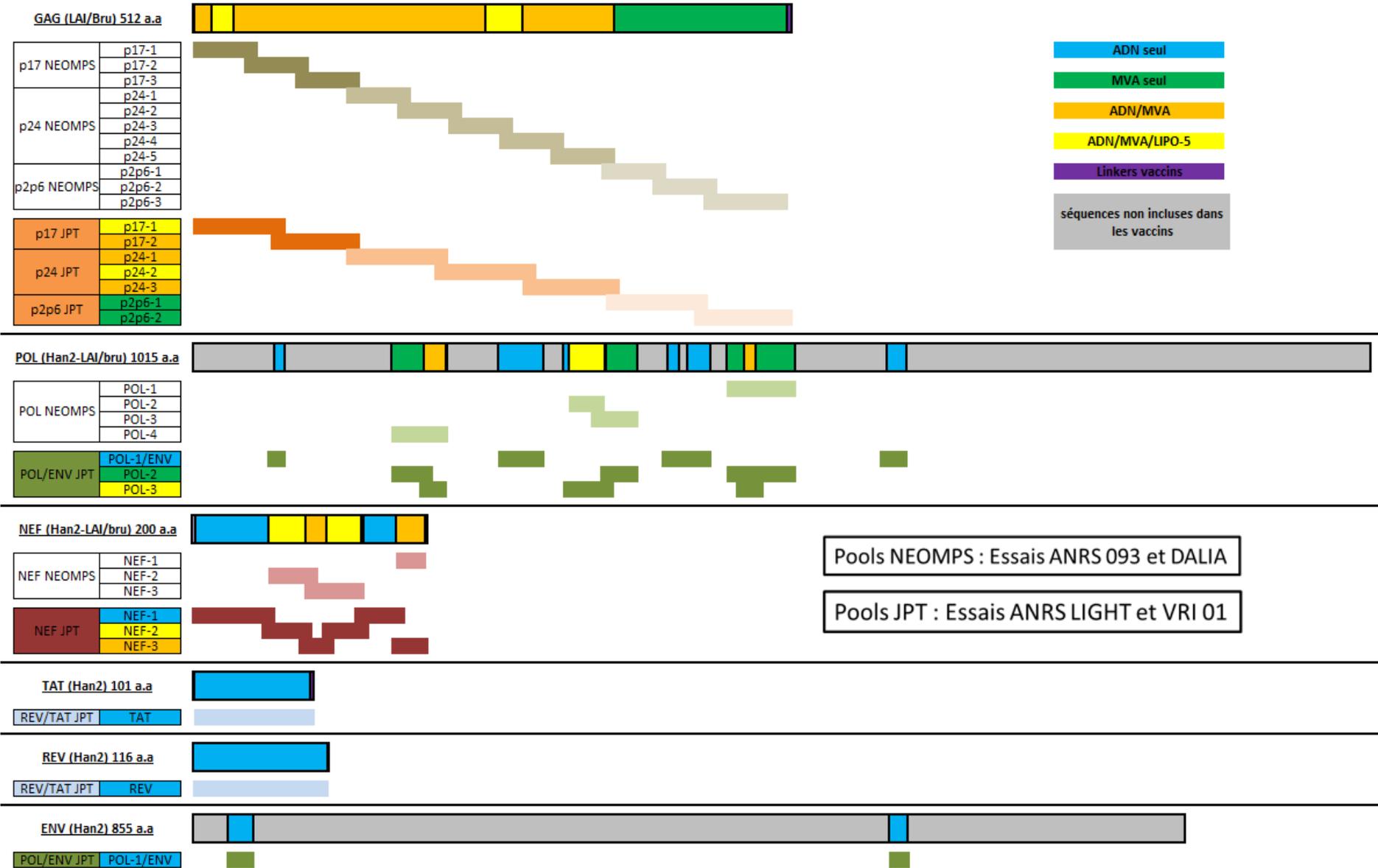


Figure 50 : Pools de peptides 15-mers et séquences vaccinales des principaux vaccins utilisés dans les essais ANRS

# **Résultats**

## **I. Première partie : Comparaison des réponses IFN $\gamma$ anti-VIH-1 induites par différentes stratégies vaccinales utilisant des lipopeptides**

L'ELISpot IFN $\gamma$  est une technique rapide, peu chère, et sensible permettant la détection des réponses cellulaires. Elle est utilisée classiquement dans la recherche vaccinale contre le VIH-1 afin de détecter les LT spécifiques de l'antigène (Streeck et al., 2009). L'utilisation de l'ELISpot IFN $\gamma$ , qui est une technique standardisée, permet donc la comparaison de l'immunogénicité de candidats vaccins testés dans différents essais vaccinaux. Le but de ce premier objectif était ainsi de mettre en évidence des éventuelles différences concernant les fréquences de sujets répondeurs ainsi que les principales régions vaccinales ciblées par les LT des volontaires sains et des patients vaccinés dans différents essais cliniques, et ainsi déterminer si un candidat vaccin ou un schéma vaccinal était supérieur aux autres. Pour cela, j'ai utilisé les données brutes des ELISpot IFN $\gamma$  réalisés dans les essais thérapeutiques ANRS 093, DALIA et ANRS LIGHT, ainsi que dans l'essai prophylactique VRI 01. J'ai participé à la réalisation de tous ces tests ELISpot IFN $\gamma$  dont les résultats ont été publiés, exceptés pour les essais LIGHT et VRI 01.

La comparaison de ces résultats n'a pas été évidente, et ce pour deux raisons principales :

1) Les critères de validité et de positivité des résultats n'étaient pas homogènes entre les essais, il fallait donc homogénéiser ces critères :

- les critères de validité du test, notamment la limite du bruit de fond (cellules non stimulées) acceptable n'existait pas pour l'essai ANRS 093 alors qu'elle était fixée à 100 SFC (« spot forming cells ») /million de PBMC pour l'essai DALIA et 50 SFC/million de PBMC pour les essais LIGHT et VRI 01. J'ai alors décidé de fixer un seuil de validité du bruit de fond à 100 SFC/million de PBMC pour tous les essais afin de ne pas invalider trop de résultats de l'essai ANRS 093 qui utilisait des PBMC ayant parfois été isolées plus de 24h après le prélèvement sanguin (en effet, dans le cas d'une viabilité cellulaire légèrement plus faible, le bruit de fond peut être augmenté). Ainsi, 70% des tests ELISpot IFN $\gamma$  réalisés dans l'essai ANRS 093 ont été validés.

- le seuil de positivité était fixé à 2 fois le bruit de fond et 100 SFC/million de PBMC au-dessus du bruit de fond pour l'essai ANRS 093 alors qu'il était fixé à 4 fois le bruit de fond avec un minimum de 55 SFC/million de PBMC pour les autres essais. J'ai décidé d'appliquer un seuil de positivité de 4 fois le bruit de fond avec un minimum de 55 SFC/million de PBMC, utilisé classiquement dans l'analyse des ELISpot IFN $\gamma$  dans le domaine du VIH.

- de plus, j'ai considéré comme répondeurs uniquement les pools de peptides qui étaient négatifs avant vaccination, comptabilisant ainsi seulement les réponses réellement induites par la vaccination.

- Un patient a donc été considéré comme répondeur si j’observais chez ce dernier une réponse positive après vaccination vis-à-vis d’au moins un pool de peptides qui était négatif avant vaccination.

2) Comme précisé dans le matériel et méthodes, les pools de peptides 15-mers utilisés entre les essais n’étaient pas exactement les mêmes (**Figure 50**). Afin de pouvoir comparer les réponses vis-à-vis des différentes régions de LIPO-5 entre les différents essais, j’ai dû considérer les 2 régions vaccinales Nef 66-97 et Nef 116-145 comme une seule région. En effet, lors de l’analyse des réponses, je me suis principalement intéressé aux réponses dirigées contre les séquences du VIH-1 incluses dans le vaccin LIPO-5 car ces séquences vaccinales sont des séquences du VIH-1 conservées entre les différents sous-types (**Tableau 9**) et donc particulièrement importantes à cibler pour les LT des individus vaccinés.

Séquences incluses dans LIPO-5 : souche LAI, Sous-type B		Homologie (%)								Homologie globale
		CONSENSUS_A1	CONSENSUS_A2	CONSENSUS_B	CONSENSUS_C	CONSENSUS_D	CONSENSUS_F1	CONSENSUS_G	CONSENSUS_H	
Gag 17-35	EKIRLRPGGKKYKLVHIV	89	89	100	84	95	84	84	89	89
Gag 253-284	NPPIPVGEIYKRWIIILGNKIVRMYSPTSILD	94	97	100	94	97	91	97	94	95
Nef 66-97	VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGGL	91	88	91	91	94	94	88	91	91
Nef 116-145	HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL	90	90	90	93	80	90	80	87	88
Pol 325-355	AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYIYQYMDLTY	94	97	100	94	97	91	97	94	95
LIPO-5	Total	92	92	96	91	93	90	89	91	92

**Tableau 9 : Conservation des séquences de LIPO-5 parmi les différents sous-types du VIH-1**

Les résultats de la « méta-analyse » des données ELISpot IFN $\gamma$  des différents essais sont présentés dans les **Tableaux 10 et 11**.

L’essai prophylactique ANRS VRI 01 utilisait 3 différents candidats vaccins dans différentes stratégies de « prime-boost », sans groupe placebo (**Tableau 10**).

Après le « prime », on remarque que seul le MVA est immunogène avec un taux de répondeur de 60%. Après le « boost » LIPO-5, ce taux de répondeur diminue à 35%. Concernant les autres stratégies, le « prime » LIPO-5 suivi du « boost » MVA donne un taux de répondeur de 43% tandis que le « prime » ADN suivi du « boost » MVA se démarque avec le taux de répondeur le plus élevé, 68%. Malgré tout, les différences de taux de répondeurs entre les bras MVA / LIPO-5, LIPO-5 / MVA et ADN / MVA ne sont pas significatives avec le test statistique de Fischer. Enfin on remarque que le groupe ayant reçu un « prime » ADN suivi d’un « boost » LIPO-5 ne contient aucun répondeur.

Lorsqu’on s’intéresse au taux d’efficacité vaccinale sur les séquences conservées (nombre de réponses vaccinales LIPO-5 induites / nombres de réponses vaccinales LIPO-5 possible pour tous les

patients testés), on s'aperçoit que la combinaison ADN / MVA est également la meilleure avec un taux de 20%, devant les combinaisons LIPO-5 / MVA (17%) et MVA / LIPO-5 (6%).

Concernant la spécificité des réponses, 53% des réponses induites après le « prime » MVA ciblent des séquences conservées de LIPO-5. Parmi ces séquences conservées, le MVA induit clairement des réponses immunodominantes vis-à-vis des régions Gag 17-35 et Pol 325-355, et le « boost » LIPO-5 ne modifie pas cette immunodominance. Par contre, on remarque qu'un « prime » LIPO-5 avant le « boost » MVA permet de diversifier la réponse à l'ensemble des régions conservées de LIPO-5 qui représentent alors 64% des réponses induites. Ce phénomène a déjà été observé par un autre groupe travaillant sur un vaccin utilisant également des séquences conservées de Gag p24 ([Kulkarni et al., 2014](#)). En effet, cette équipe a montré qu'un « prime » avec le vaccin Gag p24 suivi d'un « boost » par la protéine entière Gag p55, et non l'inverse, permettait de focaliser les réponses sur les régions conservées de Gag p24. De manière intéressante, le « prime » ADN permet également de diversifier les réponses sur l'ensemble des régions conservées de LIPO-5 mais il induit 50% des réponses hors des séquences LIPO-5. De manière surprenante, bien que la protéine Nef soit intégrée entièrement dans le vaccin ADN et partiellement dans le vaccin MVA, les régions N66-97 et Nef 116-145 sont très peu ciblées par les LT des vaccinés après l'immunisation avec ces 2 vaccins dans cet essai prophylactique.

On peut donc conclure de cet essai prophylactique que :

- 1) Seul le MVA est immunogène après le « prime » et il permet l'induction de réponses préférentielles contre les régions conservées Gag 17-35 et Pol 325-355 de LIPO-5.
- 2) La combinaison ADN / MVA semble être la plus immunogène.
- 3) L'utilisation de LIPO-5 et d'ADN en « prime » avant le « boost » de MVA permet de modifier l'immunodominance et de focaliser les réponses contre toutes les régions conservées de LIPO-5.

## Résultats – Première partie : Comparaison des réponses IFN $\gamma$ anti-VIH-1

Essai Prophylactique			VRI 01	VRI 01	VRI 01	VRI 01	VRI 01	VRI 01	VRI 01
vaccin			MVA x2	LIPO-5 x2	DNA x3	MVA + LIPO-5 x2 x2	LIPO-5 + MVA x2 x2	DNA + LIPO-5 x3 x2	DNA + MVA x3 x2
répondeurs (induction de réponse) après toutes les injections			12/20 (60%)	1/21 (5%)	0/38 (0%)	7/20 (35%)	9/21 (43%)	0/19 (0%)	13/19 (68%)
Pools 15-mers Neomps	Pools 15-mers JPT	Région LIPO-5	Fréquence parmi les réponses (n = 19) à S10	Fréquence parmi les réponses (n = 1) à S10	Fréquence parmi les réponses (n = 0) à S14	Fréquence parmi les réponses (n = 10) à S30	Fréquence parmi les réponses (n = 22) à S30	Fréquence parmi les réponses (n = 0) à S30	Fréquence parmi les réponses (n = 30) à S30
p17-1	p17-1	Gag 17-35	7/19 (37%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)	3/10 (30%)	3/22 (14%)	0 (0%)	7/30 (23%)
p24-3 + p24-4	p24-2	Gag 253-284	0/19 (0%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)	0/10 (0%)	3/22 (14%)	0 (0%)	4/30 (13%)
N2 + N3	N2	Nef 66-97 + Nef 116-145	0/19 (0%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)	0/10 (0%)	2/22 (9%)	0 (0%)	1/30 (3%)
P2 + P3	P3	Pol 325-355	3/19 (16%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)	2/10 (20%)	6/22 (27%)	0 (0%)	3/30 (10%)
autres	autres	autres régions vaccinales	8/19 (42%)	0/1 (0%)	0/0 (0%)	5/10 (50%)	8/22 (36%)	0 (0%)	15/30 (50%)
		hors vaccin	1/19 (5%)	1/1 (100%)	0/0 (0%)	0/10 (0%)	0/22 (0%)	0 (0%)	-
<b>Taux de réponse spécifique LIPO-5 (%)</b>			<b>53</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	<b>50</b>
<b>Taux d'efficacité LIPO-5 (%)</b>			<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>20</b>

Taux de réponse spécifique LIPO-5 = nombre de réponses vaccinales LIPO-5 / nombre de réponses totales x 100

taux d'efficacité vaccinale = nombre de réponses vaccinales LIPO-5 induites / nombre de réponses vaccinales LIPO-5 possibles ( 4 régions x nombre de patients testés) x 100

Fréquence de réponse inférieure à 15%

Fréquence de réponse supérieure à 15%

**Tableau 10 : Induction des réponses IFN $\gamma$  détectées par test ELISpot chez les volontaires de l'essai prophylactique ANRS VRI**

Essais Thérapeutiques			DALIA	ANRS 093	ANRS 093	ANRS 093	ANRS 093	LIGHT	LIGHT	LIGHT	LIGHT
vaccin			LIPO-5 loadé sur DC x 4	ALVAC + LIPO-6T x 4	PLACEBO	ALVAC + LIPO-6T x 4 + IL-2	PLACEBO	DNA x 3	PLACEBO	DNA + LIPO-5 x 3 x 2	PLACEBO
répondeurs (induction de réponse) après toutes les injections vaccinales (%)			13/16 (81%)	5/15 (33%)	5/12 (42%)	14/23 (61%)	10/22 (45%)	13/58 (22%)	7/32 (22%)	23/58 (40%)	10/31 (32%)
Pools 15-mers Neomps	Pools 15-mers JPT	Région LIPO-5	Fréquence parmi les réponses (n = 30) à S16	Fréquence parmi les réponses (n = 9) à S16	Fréquence parmi les réponses (n = 6) à S16	Fréquence parmi les réponses (n = 34) à S36	Fréquence parmi les réponses (n = 25) à S36	Fréquence parmi les réponses (n = 18) à S16	Fréquence parmi les réponses (n = 7) à S16	Fréquence parmi les réponses (n = 38) à S28	Fréquence parmi les réponses (n = 15) à S28
p17-1	p17-1	Gag 17-35	5/30 (17%)	1/9 (11%)	1/6 (17%)	2/34 (6%)	3/25 (12%)	2/18 (13%)	0/7 (0%)	2/38 (5%)	1/15 (4%)
p24-3 + p24-4	p24-2	Gag 253-284	10/30 (33%)	1/9 (11%)	2/6 (33%)	5/34 (15%)	5/25 (20%)	1/18 (6%)	2/7 (29%)	13/38 (34%)	2/15 (8%)
N2 + N3	N2	Nef 66-97 + Nef 116-145	6/30 (20%)	3/9 (33%)	1/6 (17%)	6/34 (18%)	5/25 (20%)	0/18 (0%)	0/7 (0%)	1/38 (3%)	0/15 (0%)
P2 + P3	P3	Pol 325-355	5/30 (17%)	0/9 (0%)	1/6 (17%)	2/34 (6%)	0/25 (0%)	1/18 (6%)	1/7 (14%)	4/38 (11%)	1/15 (4%)
autres	autres	autres régions vaccinales	-	4/9 (44%)	1/6 (17%)	19/34 (56%)	12/25 (48%)	14/18 (78%)	4/7 (57%)	18/38 (47%)	11/15 (73%)
		hors vaccin	4/30 (13%)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Taux de réponse spécifique LIPO-5 (%)</b>			<b>87</b>	<b>56</b>	<b>83</b>	<b>44</b>	<b>52</b>	<b>22</b>	<b>43</b>	<b>53</b>	<b>27</b>
<b>Taux d'efficacité LIPO-5 (%)</b>			<b>41</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>3</b>

Taux de réponse spécifique LIPO-5 = nombre de réponses vaccinales LIPO-5 / nombre de réponses totales x 100

taux d'efficacité vaccinale = nombre de réponses vaccinales LIPO-5 induites / nombre de réponses vaccinales LIPO-5 possibles ( 4 régions x nombre de patients testés) x 100

Fréquence de réponse inférieure à 15%

Fréquence de réponse supérieure à 15%

**Tableau 11 : Induction des réponses IFN $\gamma$  détectées par test ELISpot chez les volontaires des essais thérapeutiques ANRS DALIA, ANRS 093 et LIGHT**

Concernant les essais thérapeutiques (**Tableau 11**), on remarque que l'essai DALIA, utilisant des cellules dendritiques chargées avec le LIPO-5, donne de loin le meilleur taux de répondeurs (81%), le meilleur taux de réponse spécifique vis-à-vis des régions conservées de LIPO-5 (87%), et le meilleur taux d'efficacité vaccinale (41%).

Dans l'essai LIGHT, on observe un faible taux de répondeur après le « prime » ADN (22%) qui est identique au taux de répondeur chez les placebos. En effet, on observe un nombre de réponses induites proportionnellement identique dans les groupes vaccinés et placebos avec une efficacité vaccinale estimée à 2%. Après le « boost » LIPO-5, le taux de répondeur augmente à 40% chez les vaccinés alors qu'il est de 32% chez les placebos. L'efficacité vaccinale est alors estimée à 9% chez les vaccinés.

L'analyse de l'essai ANRS 093 est plus compliquée avec un taux de répondeur de 33% et 42% à S16 dans les groupes vaccinés et placebos, respectivement. Après les cures d'IL-2, les taux de répondeurs augmentent dans les 2 groupes pour atteindre 61% chez les vaccinés et 45% chez les placebos, avec un nombre de réponses induites augmentées mais proportionnellement identique dans les 2 groupes (efficacité vaccinale estimée à 16%).

Concernant la spécificité des réponses, on remarque que le vaccin utilisé dans l'essai DALIA induit des réponses contre les 5 régions conservées de LIPO-5 et que la région Gag 253-284 semble immunodominante.

Concernant l'essai LIGHT, le « boost » LIPO-5 permet d'observer clairement une focalisation des réponses sur les régions conservées incluses dans ce vaccin (53% des réponses dirigées contre les régions de LIPO-5 après le « boost » contre 23% seulement après le « prime »), en particulier concernant la région Gag 253-284, avec 34% des réponses détectées dirigées contre cette région.

Dans l'essai ANRS 093, l'association de LIPO-6T avec l'ALVAC vCP1433 induit environ la moitié des réponses hors des régions conservées spécifiques de LIPO-5. L'IL-2 ne semble pas modifier drastiquement l'immunodominance, et Nef est la région conservée la plus ciblée (33% de toutes les réponses détectées à S16).

On peut donc conclure de ces essais thérapeutiques que :

- 1) Le vaccin constitué de cellules dendritiques chargées par LIPO-5 est le plus immunogène.
- 2) La mise en place d'un bras placebo dans tous les futurs essais est très importante compte-tenu du nombre important de réponses induites détectées dans ce groupe.
- 3) L'administration d'IL-2 après les vaccinations permet d'augmenter le nombre de réponses spécifiques anti-VIH-1. Cela peut s'expliquer car il a été montré dans cet essai

que l'administration d'IL-2 induisait une diminution de la population T régulatrice spécifique du VIH-1 permettant alors l'augmentation de réponses T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD134<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 (Brezar et al., 2017).

- 4) Malgré le faible taux de répondeur observé dans l'essai LIGHT, un « boost » avec LIPO-5 permet de diriger les réponses vers les régions conservées de LIPO-5 suite à un « prime » ADN.
- 5) Comme cela avait déjà été montré précédemment (Castelli et al., 2013; Salmon-Céron et al., 2010), Gag 253-284 est la région la plus immunodominante de LIPO-5.

**Remarque :** Ces différents protocoles vaccinaux n'ayant pas induit de fortes réponses IFN $\gamma$  par technique ELISpot, l'intensité des réponses n'a pas été étudiée plus en détail.

#### **Conclusions générales de la première partie :**

Parmi les candidats vaccins prophylactiques comparés dans l'essai ANRS VRI 01, la combinaison ADN / MVA semble être la plus immunogène. En effet c'est la seule permettant un taux de répondeur supérieur à 50% (qui était le critère de sélection d'une des stratégies vaccinales de l'essai). Par contre, on remarque chez ces volontaires sains vaccinés que l'utilisation en « prime » (mais pas en « boost ») du vaccin LIPO-5 permet un meilleur ciblage des régions conservées du VIH-1 incluses dans LIPO-5 par rapport à l'utilisation de MVA ou de vaccin ADN.

De manière surprenante, chez les patients séropositifs pour le VIH-1 vaccinés dans l'essai LIGHT, on observe que le vaccin LIPO-5 utilisé en « boost » (après un « prime » avec un vaccin ADN) permet de focaliser les réponses majoritairement sur la région conservée immunodominante Gag 253-284. Une des raisons pouvant expliquer cette différence avec les volontaires sains pourrait être le time-point d'évaluation de l'immunogénicité qui était situé 4 semaines après la dernière vaccination dans l'essai LIGHT mais seulement 2 semaines après la dernière immunisation l'essai VRI 01. Une autre hypothèse, plus probable selon moi, est la possible existence de faibles réponses (non positives) avant vaccination vis-à-vis de cette région chez les patients infectés par le VIH-1. Ces réponses seraient alors en réalité boostées et non induites par le vaccin LIPO-5 chez ces patients. Pour aller dans ce sens, on remarque également que le LIPO-5 et l'ALVAC/LIPO-6T permettent bien l'induction de réponses vis-à-vis de la région centrale de Nef (Nef 66-97 et Nef 116-145) dans les essais DALIA et ANRS 093, respectivement alors que ce n'est pas le cas du MVA ou de l'ADN dans l'essai VRI 01. Si le

vaccin ADN contient bien la protéine Nef entière, pouvant éventuellement modifier l'immunodominance des réponses observées, ce n'est pas le cas du MVA qui contient le même polypeptide Pol/Nef que l'ALVAC. Cela suggère donc fortement là encore que ces réponses étaient certainement présentes à faible intensité chez les patients infectés par le VIH-1 et qu'elles ont été boostées par les vaccins reçus par les patients. Par contre, de manière intéressante, la combinaison utilisant le LIPO-5 en « prime » puis le MVA en « boost » semble bien permettre l'induction de réponses vis-à-vis de la région centrale de Nef chez des volontaires sains.

Parmi les vaccins thérapeutiques étudiés, l'utilisation de LIPO-6T en association avec l'ALVAC vCP1433 n'est pas très immunogène dans l'essai ANRS 093 et le LIPO-5 utilisé en « boost » après un « prime » ADN dans l'essai ANRS LIGHT non plus. Par contre, le LIPO-5 chargé sur des DC utilisé dans l'essai ANRS DALIA est lui particulièrement immunogène. En effet il induit le meilleur taux de répondeur (81%), le meilleur taux de réponse spécifique vis-à-vis des régions conservées de LIPO-5 (87%), et le meilleur taux d'efficacité vaccinale (41%). Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'aller plus loin dans l'étude des réponses observées dans cet essai, cela fait l'objet de la deuxième partie de cette thèse.

## II. Deuxième partie : Epitope mapping de l'essai ANRS DALIA, article publié dans PLOS Pathogens

L'identification et la caractérisation des épitopes ciblés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> induits par la vaccination thérapeutique contre le VIH sont essentielles afin d'élucider la nature des réponses cellulaires protectrices et les mécanismes de l'évasion immunitaire du VIH-1.

Pour ce deuxième objectif, nous nous sommes donc intéressés à l'identification et à la caractérisation des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> anti-VIH-1 observées chez des patients infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral, après vaccination par des cellules dendritiques générées *ex vivo* chargées par LIPO-5 lors de l'essai de vaccination thérapeutique ANRS DALIA. Après 4 injections de DC chargées avec les lipopeptides Nef 66-97, Nef 116-145, Gag 17-35, Gag 253-284 et Pol 325-355, nous avons observé des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 produisant de l'IFN $\gamma$ , de la perforine, du granzyme A et du granzyme B ; ainsi que des LT CD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL-13. Ces réponses étaient dirigées contre des épitopes dominants et sous-dominants situés dans toutes les régions vaccinales conservées de Gag, Pol et Nef. De façon intéressante, nous avons observé que l'IL-2 et l'IL-13 produites par les LT CD4<sup>+</sup> étaient corrélées négativement avec le pic de réplication virale après l'interruption du traitement antirétroviral (phase d'ATI). La cartographie épitopique a confirmé que la vaccination a généré des réponses T CD8<sup>+</sup> vis-à-vis d'épitopes connus, mais a également permis d'identifier 8 nouveaux épitopes T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 restreints par différentes molécules HLA-DRB1.

Ces résultats pourraient aider à mieux concevoir les futurs vaccins thérapeutiques et soulignent le rôle important des réponses T CD4<sup>+</sup> générées par un vaccin dans le contrôle de la réplication du VIH-1.

***PLoS Pathog.* 2019 Sep 9;15(9):e1008011. doi: 10.1371/journal.ppat.1008011. eCollection 2019 Sep.**

RESEARCH ARTICLE

# Anti-HIV potency of T-cell responses elicited by dendritic cell therapeutic vaccination

Mathieu Surenaud<sup>1</sup>, Monica Montes<sup>2</sup>, Cecilia S. Lindestam Arlehamn<sup>3</sup>, Alessandro Sette<sup>3,4</sup>, Jacques Banchereau<sup>2a</sup>, Karolina Palucka<sup>2a</sup>, Jean-Daniel Lelièvre<sup>1,5</sup>, Christine Lacabaratz<sup>1¶</sup>, Yves Lévy<sup>1,5¶\*</sup>

**1** Vaccine Research Institute, INSERM U955—Université Paris-Est Créteil, Créteil, France, **2** Baylor Institute for Immunology Research, Center for Human Vaccines, Dallas TX, United States of America, **3** La Jolla Institute for Immunology, Department of Vaccine Discovery, La Jolla, California, United States of America, **4** University of California San Diego, Department of Medicine, La Jolla, California, United States of America, **5** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service d'Immunologie Clinique, Créteil, France

¶ Current address: The Jackson Laboratory for Genomic Medicine, Farmington, CT, United States of America

¶ These authors contributed equally to this work.

\* [yves.levy@aphp.fr](mailto:yves.levy@aphp.fr)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Surenaud M, Montes M, Lindestam Arlehamn CS, Sette A, Banchereau J, Palucka K, et al. (2019) Anti-HIV potency of T-cell responses elicited by dendritic cell therapeutic vaccination. *PLoS Pathog* 15(9): e1008011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011>

**Editor:** Guido Silvestri, Emory University, UNITED STATES

**Received:** May 15, 2019

**Accepted:** July 30, 2019

**Published:** September 9, 2019

**Copyright:** © 2019 Surenaud et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files

**Funding:** "This study was supported by the Investissement d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77 and by the Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS), the Vaccine Research Institute (VRI). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

## Abstract

Identification and characterization of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes elicited by HIV therapeutic vaccination is key for elucidating the nature of protective cellular responses and mechanism of the immune evasion of HIV. Here, we report the characterization of HIV-specific T-cell responses in cART (combination antiretroviral therapy) treated HIV-1 infected patients after vaccination with *ex vivo*-generated IFN $\alpha$  Dendritic Cells (DCs) loaded with LIPO-5 (HIV-1 Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284 and Pol 325–355 lipopeptides). Vaccination induced and/or expanded HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN $\gamma$ , perforin, granzyme A and granzyme B, and also CD4<sup>+</sup> T cells secreting IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13. These responses were directed against dominant and subdominant epitopes representing all vaccine regions; Gag, Pol and Nef. Interestingly, IL-2 and IL-13 produced by CD4<sup>+</sup> T cells were negatively correlated with the peak of viral replication following analytic treatment interruption (ATI). Epitope mapping confirmed that vaccination elicited responses against predicted T-cell epitopes, but also allowed to identify a set of 8 new HIV-1 HLA-DR-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes. These results may help to better design future DC therapeutic vaccines and underscore the role of vaccine-elicited CD4<sup>+</sup> T-cell responses to achieve control of HIV replication.

## Author summary

Improvement of therapeutic vaccine strategies in the perspective of HIV cure is warranted and one of the determinant factors for elucidating the nature of protective cellular responses is the identification and characterization of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes elicited by the vaccine. However, fine characterization of vaccine response at the level of

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

individual peptides contained in therapeutic vaccines is lacking. Here, we report in-depth characterization of HIV-specific T-cell responses observed in antiretroviral therapy treated HIV-1 infected patients after vaccination with autologous *ex vivo*-generated IFN $\alpha$  DCs loaded with 5 long HIV peptides coupled to a lipid tail. Our study shows that dominant and subdominant epitopes from Gag, Pol, and Nef vaccine regions are targeted by HIV-specific CD8<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> T cells and that vaccine-elicited HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells producing IL-2 and IL-13 are significantly correlated with a better viral control following treatment interruption. These results underscore the role of vaccine-elicited CD4<sup>+</sup> T-cell responses to achieve control of HIV replication and thus may inform the design of better therapeutic vaccines.

## Introduction

Globally, an estimated 36.9 million people were living with Human Immunodeficiency Virus (HIV) in 2017, among them 59% were accessing antiretroviral therapy [1]. Introduction of combination antiretroviral therapy (cART) since the late 1990's decreased HIV-related morbidity and mortality [2] and reduced the risk of HIV transmission [3]. However, cART requires a life-long adherence to treatment, has potential long-term side-effects [4], and poor adherence can result in the development of resistance [5]. HIV infection has also been shown to result in more prevalent age-associated non-communicable comorbidities like peripheral arterial, cardiovascular disease, and impaired renal function as compared to HIV-uninfected controls [6]. Furthermore, among well-treated HIV-infected individuals  $\geq 50$  years without comorbidity or AIDS-defining events, the estimated median survival time remains lower than in the general population [7]. Importantly, cART is not able to eradicate HIV infection and the virus persists in long-lived reservoir cells [8] leading to the inevitable rebound of HIV within few days following cART interruption [9]. Thus, strengthened by recent scientific advances, the field is focused on development of strategies able to improve the immune control of HIV replication and to prolong the period of remission (i.e. HIV control without cART) leading to improvement of quality of life, decrease in morbidity and sparing costs.

Vaccines are essential elements of these functional cure strategies. The rationale of therapeutic immunization relies on the induction of HIV-specific cellular responses through the improvement of the magnitude of preexisting T-cell immune responses elicited by the natural infection which are not able to control HIV replication [10]. A common endpoint in vaccine trials is measurement of the breadth and magnitude of vaccine-induced CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses. Identification and characterization of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes, as well as the restricting HLA alleles can play a major role in elucidating the nature of protective cellular responses and mechanism of the immune evasion of HIV. CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes are typically 8-11-mer peptides restricted by HLA class I [11] and CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes are 12-20-mer peptides restricted by HLA class II [12]. A large number of HIV epitopes have been identified and deposited into various databases. The growing amount of class-I and class-II HLA / peptide-binding data generated by experimental methods has supported the generation of more sophisticated, computational tools which can predict CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes within viral proteomes by using different data-driven bioinformatic approaches including Artificial Neural Network (ANN), Support Vector Machines, hidden Markov models, as well as other motif search algorithms. Using these HLA binding predictors can improve the efficiency of epitope mapping protocols in vaccine trials [13].

To achieve an optimal effect of therapeutic vaccination, the choice of antigens and vector is of critical importance. Several HIV-1 therapeutic candidate vaccines are currently under evaluation

and one particularly considered approach is the use of dendritic cell (DC)-based vaccines [14]. Indeed, since DCs are the most powerful antigen-presenting cells (APCs) to initiate generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses [15], it has been suggested that *ex vivo*-generated DCs might be the most potent activator of T-cell responses avoiding the use of potentially toxic adjuvants. The DALIA phase I trial evaluated a new DC-based therapeutic vaccine that consisted of *ex vivo*-generated IFN $\alpha$  DCs loaded with 5 HIV-1 lipopeptides in 19 cART-treated HIV-1 infected patients [16]. These lipopeptides (Gag 17–35, Gag 253–284, Nef 66–97, Nef 116–145 and Pol 325–355) were composed of HIV-1 clade B regions rich in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes [17–18] that have shown induction of cellular immune responses in a phase II clinical trial in healthy volunteers [19]. We have shown that DALIA vaccination was well tolerated and increased the breadth and functionality of HIV-1 specific immune responses. Moreover, the DALIA study design included a 6-month analytic treatment interruption (ATI) which allowed to show an inverse correlation between the peak of viral load after ATI and the frequency of poly-functional CD4<sup>+</sup> T-cell responses after vaccination [20].

In the present study, we performed more in-depth epitope mapping to dissect anti-HIV-1 specific immune responses in order to better characterize vaccine responses associated with the control of viral load post-ATI. We showed that viral control was associated with the breadth and magnitude of IL-2 and IL-13 CD4<sup>+</sup> T-cell responses targeting both immunodominant and subdominant HIV-1 peptides included in Gag, Pol and Nef vaccine regions. These results highlight the potential use of IL-13 as a new biomarker of HIV-1 vaccine efficacy and may help to better design the future DC therapeutic vaccine trials.

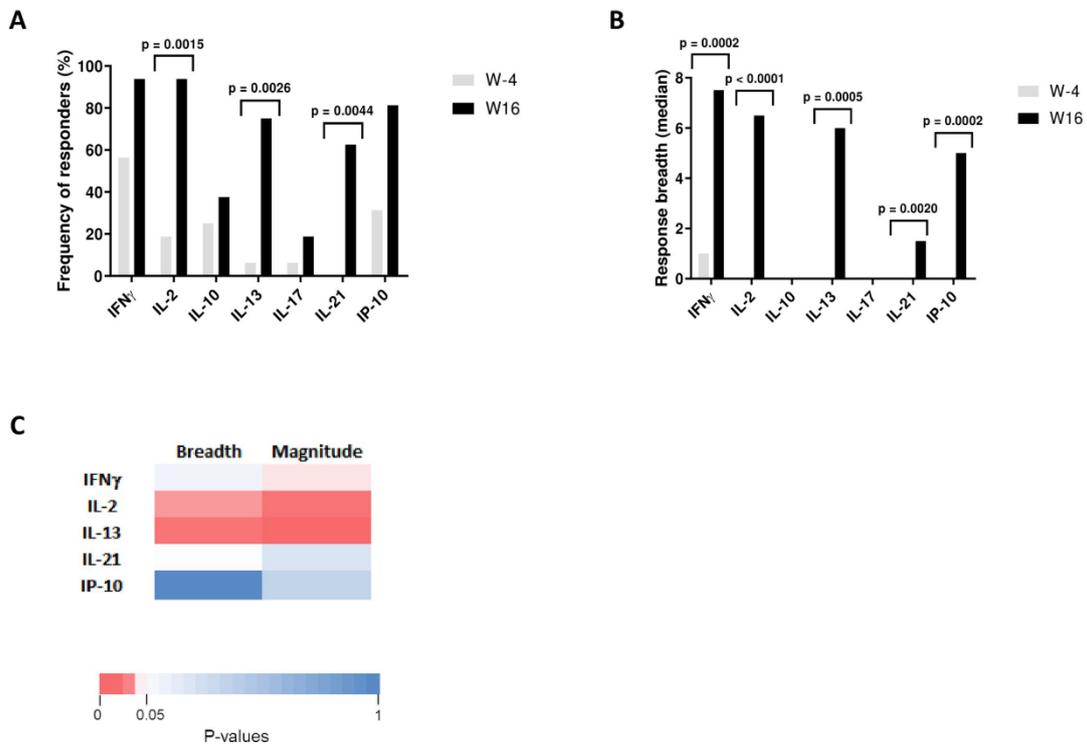
## Results

### DALIA vaccine regimen broadened breadth of HIV-specific immune responses

We previously showed that DALIA DC-based therapeutic vaccination (see [Materials and Methods](#) section and [S1 Fig](#) for study design) induced and increased HIV-1 specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell immune responses and a broad repertoire of cytokine producing cells [20]. To better characterize these responses, we analyzed the production of cytokines before (W-4) and after (W16) vaccination in PBMCs stimulated with individual 15-mer peptides (overlapping by 11 amino acids) spanning the LIPO-5 vaccine regions using Luminex technology. Positive responses were defined as production of at least one detectable cytokine following individual peptide stimulation (see [Materials and Methods](#) section and [S1 Table](#)). As shown in [Fig 1A](#), at W16 a production of cytokines was observed in a higher proportion of patients as compared to baseline; IFN $\gamma$  (94% at W16 / 56% at baseline), IL-2 (94% / 19%,  $p < 0.05$ ), IL-13 (75% / 6%,  $p < 0.05$ ), IL-21 (63% / 0%,  $p < 0.05$ ) and IP-10 (81% / 31%). As shown in [Fig 1B](#), vaccination also significantly increased the breadth of responses. At baseline, the median number of epitopes inducing the production of at least one cytokine (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 or IP-10) were between 0–1 (range 0–7). After vaccination, these numbers were significantly increased ( $p < 0.05$ ) for IFN $\gamma$ , IL-2, IL-13, IL-21 and IP-10 (median between 1.5–7.5, range 0–28). In contrast, neither IL-10 nor IL-17 responses were significantly increased after vaccination ([Fig 1A and 1B](#)). Thus, DALIA vaccine regimen broadened breadth and improved functionality of HIV-specific immune responses targeting vaccine regions.

### Vaccine-elicited cytokine responses are associated with lower viral load following cART interruption

We next correlated the breadth and the magnitude (fluorescence intensity, FI) of PBMC responses to individual HIV 15-mer peptides after vaccination (W16) and peak of plasma HIV



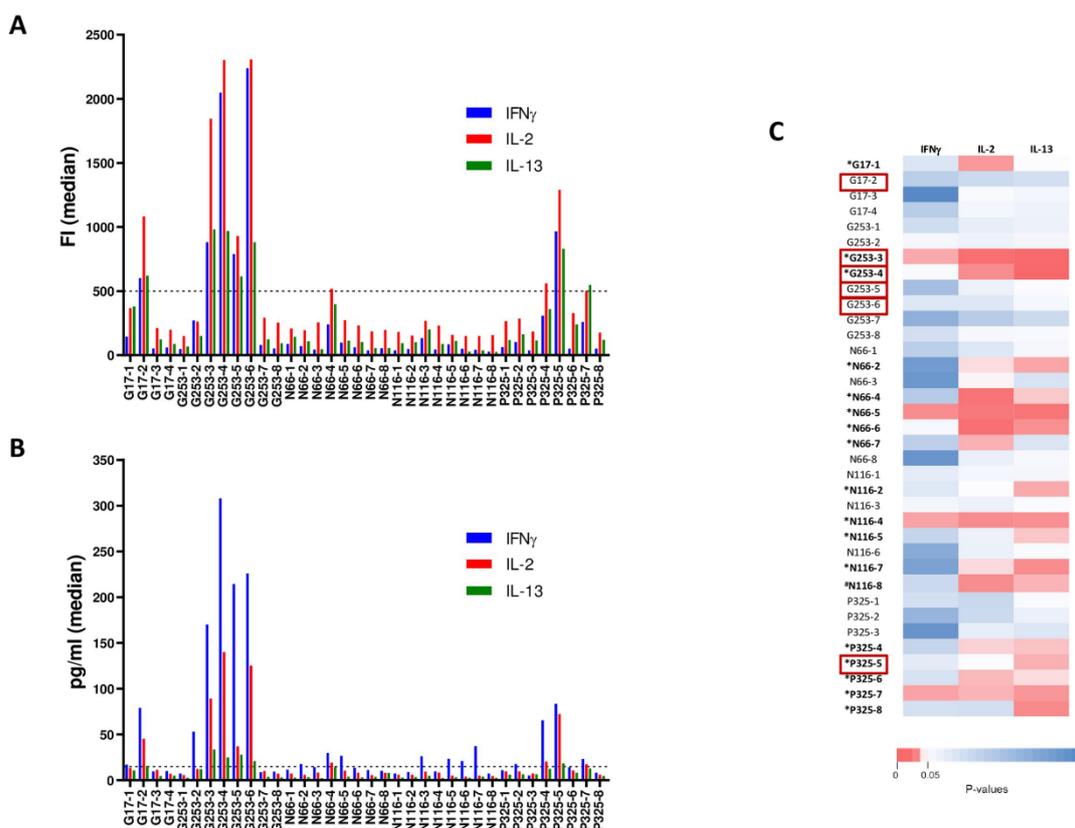
**Fig 1. Immunogenicity of DALIA vaccine.** PBMC from patients (n = 16) collected before (W-4) and after vaccination (W16) were stimulated with individual 15-mer peptide (n = 36) spanning the vaccine sequence. Cytokine production was measured in culture supernatant using a Luminex assay at 48 hours. (A) Comparison of frequency of responders for each cytokine at W-4 and W16 using McNemar's test. A patient was considered responder when he had at least one positive response. Positivity threshold was defined for each cytokine as fluorescence intensity (FI) > 90th percentile of all Non-Stimulated (NS) values and > 3-fold background (NS condition). (B) Comparison of the breadth of the responses for each cytokine at W-4 and W16 (Median, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Response breadth was defined as the number of individual peptides inducing a positive response. (C) Heatmap showing Spearman P values for correlations between maximum of plasma HIV RNA measured in patients after ATI and cytokine responses quantified by Luminex assay after vaccination at W16 from supernatants of PBMC stimulated with individual 15-mer HIV peptides. Magnitude was defined as the sum of FI for all peptide-stimulations.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011.g001>

RNA in patients following cART interruption. We found an inverse correlation (Spearman) between the maximum of plasma HIV RNA values and the number of peptides eliciting IL-2 (r = -0.58, P = 0.020), and IL-13 (r = -0.66, P = 0.007) production, and the magnitude of the response for IFN $\gamma$  (r = -0.51, P = 0.047), IL-2 (r = -0.66, P = 0.007) and IL-13 (r = -0.71, P = 0.003). No correlation was observed for IL-21 or IP-10 (Fig 1C). These results showed an association between the breadth and magnitude of vaccine-elicited functional responses at W16 and a lower viral rebound following ATI post vaccination.

### Identification of immunodominant HIV responses induced by the vaccine

Next, we sought to characterize peptide-specific IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses further, since they were significantly associated with lower viral load after ATI. Before vaccination (W-4), only a weak cytokine secretion was observed (S2 Fig). After vaccination (W16), we observed



**Fig 2. Magnitude of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses at W16.** PBMC from patients (n = 16) collected after vaccination (W16) were stimulated with individual 15-mer peptide (n = 36) spanning the vaccine sequence. Cytokine production was measured in culture supernatant using a Luminex assay at 48 hours. (A) Magnitude (FI) of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses (median). Dotted line represents an arbitrary threshold of 500 FI for the definition of strong responses. (B) Magnitude (pg/ml) of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses (median). Dotted line represents an arbitrary threshold of 150 pg/ml for the definition of strong responses. (C) Heatmap showing Spearman P values for correlations between maximum of plasma HIV RNA measured in patients after ATI and IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 cytokine responses assessed by Luminex assay after stimulations of PBMC with individual 15-mer HIV peptides. \*Peptides of interest showing at least one inverse correlation (in bold). \*Peptide showing at least one inverse correlation but did not passed positivity criteria described in methods section (in bold). Immunodominant peptides are highlighted within red rectangles.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011.g002>

that each peptide induced a similar polyfunctional cytokine profile (Fig 2A) and that 6 peptides (Gag17-2, Gag253-3, Gag253-4, Gag253-5, Gag253-6, Pol325-5) induced a stronger response in at least half of the patients, either in FI (Fig 2A) or in concentration (Fig 2B). These immunodominant peptides were derived from the HIV-1 Gag and Pol vaccine sequences and not from Nef. Individual concentration data for all peptide stimulations are provided in S2 Table. No secretion of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-13 after vaccination was observed with non-stimulated PBMC or PBMC stimulated with non-vaccine-specific HIV-1 peptides (pools of 15-mer overlapping peptides from p2p6 Gag, outside the vaccine sequence) and high secretion of these cytokines was observed using SEB stimulation (S3 Fig).

### Identification of targeted peptides associated with lower viral load following cART interruption

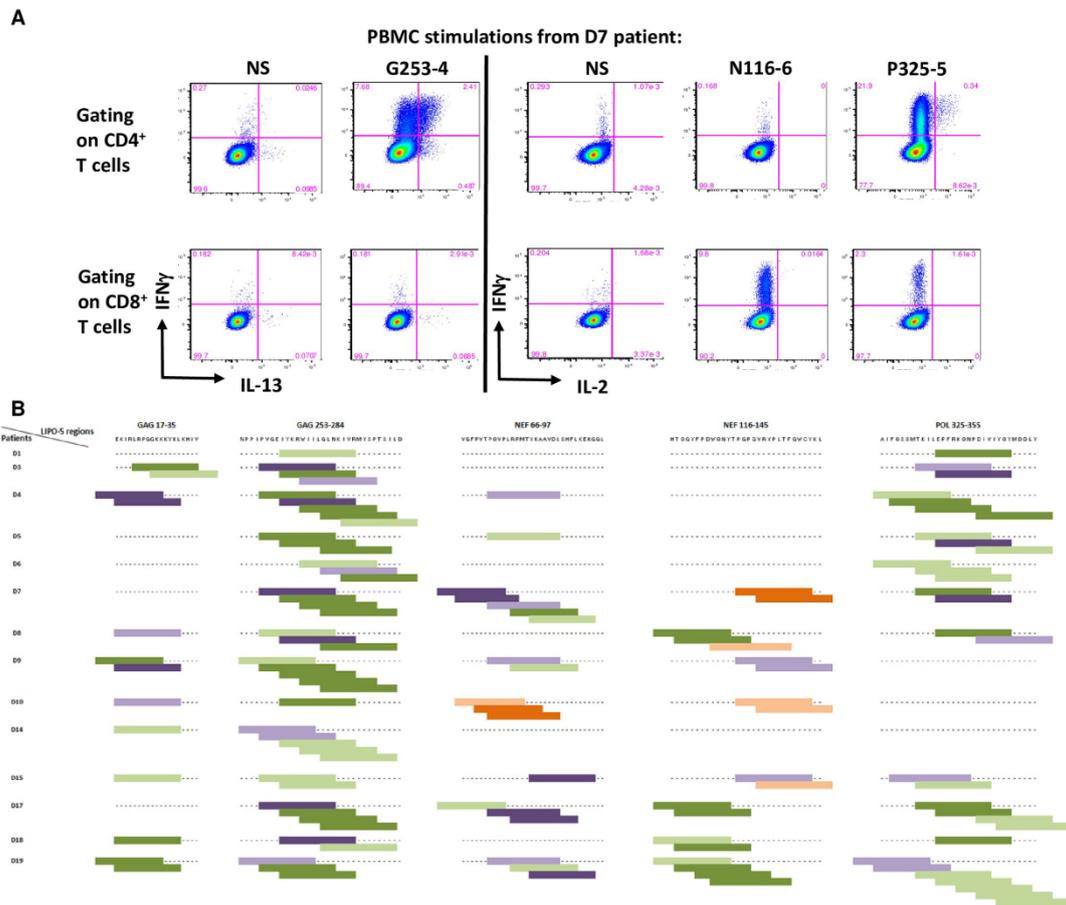
We then investigated whether peptide-specific secretion of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 cytokines observed after vaccination (W16) could be associated with viral dynamics after ATI. Thus, we correlated the magnitude of cytokine responses to the 36 individually tested peptides with the maximum viral load detected following cART interruption. For eighteen peptides, an inverse correlation (Spearman) between the maximum of HIV RNA values and magnitude of the specific response for at least one cytokine was found (Fig 2C, peptides in bold). All of them, except N116-8, passed positivity criteria described in Methods section (labeled with \*). Thus, responses elicited by the vaccination against 17 peptides of interest from Gag, Nef and Pol proteins were identified as potentially associated with control of viral load post-ATI. Interestingly, there was an overlap with 3 (Gag253-3, Gag253-4, Pol325-5) of the 6 immunodominant peptides previously identified in Fig 2A and 2B (highlighted within red rectangles).

### Identification of HIV-specific cytokine-producing T cells

Intracellular Cytokine Staining (ICS) were assessed to analyze post-vaccination HIV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses from 14 patients. Cytometry dot plots from one representative individual (D7 patient) showing an HIV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response with G253-4 peptide stimulation (IFN $\gamma$  and IL-13), an HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell response with N116-6 peptide stimulation (IFN $\gamma$  and IL-2), and a dual HIV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell response with P325-5 peptide stimulation (IFN $\gamma$  and IL-2) after vaccination are represented in Fig 3A. A total of 117 CD4<sup>+</sup> and 46 CD8<sup>+</sup> cytokine-producing T-cell responses directed to 29 and 22 peptides, respectively, were observed (Fig 3B). Although all vaccine regions induced CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, Gag 253–284 was the main targeted region for CD4<sup>+</sup> T-cell responses and Nef 66–97 was the main targeted region for CD8<sup>+</sup> T-cell responses. Immunodominant HIV 15-mer peptides previously identified in Fig 2A and 2B induced both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, but CD4<sup>+</sup> T-cell responses were more frequent. Moreover, targeted peptides associated with lower viral rebound after ATI induced either CD4<sup>+</sup> T-cell responses alone (4/16 peptides) or both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses (12/16 peptides).

Interestingly, despite the fact that some peptides were not predicted to bind HLA-DR molecules of the patients according to NetMHCIIpan 3.2 server [21], a significant frequency of CD4<sup>+</sup> T-cell responses was observed (S4A Fig). For 61 of these non-predicted HLA-DR CD4<sup>+</sup> T-cell responses, we used single HLA-DRB1 transfected cell lines as APC to try to identify the restricting DRB1 alleles involved in the IFN $\gamma$ -positive CD4<sup>+</sup> T-cell responses. We were able to identify a total of 8 new HLA-DR restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes covering 14 (23%) of the 61 T-cell responses (Table 1 and S3 Table). These epitopes were localized in HIV-1 Gag, Nef and Pol vaccine sequences. Interestingly, 3 of them were immunodominant (Gag17-2, Gag253-3 and Pol325-5) and 5 of them were associated with a lower viral rebound after ATI (Gag253-3, Nef66-5, Nef66-6, Pol325-5, and Pol325-8).

For CD8<sup>+</sup> T cells, only few responses were observed in comparison to the high frequency of patients whose HLA class I molecules were predicted to bind to the different 15-mer peptides according to NetMHCpan 4.0 server [22] (S4B Fig). For 38 IFN $\gamma$ -positive CD8<sup>+</sup> T-cell responses observed and predicted, we used 8- to 10-mer peptides in ICS assays to identify the optimal CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes. A total of 30 CD8<sup>+</sup> T-cell responses were identified (79%) of which 6 (20%) were directed towards an epitope shared by two different 15-mer peptides. So 24 unique IFN $\gamma$ -positive CD8<sup>+</sup> T-cell responses were observed, leading to the identification of a total of 18 different well-described CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes (Table 2).



**Fig 3. DALIA peptide vaccine coverage.** PBMC from patients ( $n = 14$ ) collected after vaccination (W16) were stimulated at day 0 with individual 15-mer peptides (previously inducing a positive response in Luminex assay), cultured with rIL-2, and restimulated by the same peptides at day 7. Cytokine production was measured using an ICS assay. (A) Cytometry dot plots of PBMC from one representative individual (D7 patient) stimulated with G253-4, N116-6 or P325-5 15-mer peptides. (B) Mapping of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses observed for each of the 14 patients using 15-mer peptides. Light orange: low CD4<sup>+</sup> T-cell responses, dark orange: high CD8<sup>+</sup> T-cell responses, light green: low CD4<sup>+</sup> T-cell responses, dark green: high CD4<sup>+</sup> T-cell responses, light purple: low CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, dark purple: high CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses. An ICS response was considered positive for a given cytokine if  $> 3$ -fold the negative control (unstimulated cells) and  $> 0.05\%$ . Cut off for high and low T-cell responses was defined  $< > 5\%$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011.g003>

Thus, DALIA vaccine regimen induced more CD4<sup>+</sup> than CD8<sup>+</sup> T-cell responses and 8 new HIV-1 HLA-DR-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes with their restricting HLA-DRB1 allele were identified.

**Table 1. List of new HLA-DR-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes identified.**

15-mer CD4 <sup>+</sup> T-cell epitope	Sequence	Restriction Class II HLA	Patient
Gag 17–2	EKIRLRPGGKKKYKL	DRB1*0301	D15 / D18
		DRB1*1301	D15
Gag 253–2	NPPIPVGEIYKRWII	DRB1*1301	D14
<b>*Gag 253–3</b>	PVGEIYKRWIIIGLN	DRB1*0402	D5
		DRB1*1301	D14 / D15
Nef 66–1	GLTMTVMGFPVTPQVP	DRB1*0401	D7
<b>*Nef 66–5</b>	RPMTYKAAVDLSHFL	DRB1*1401	D17
<b>*Nef 66–6</b>	YKAAVDLSHFLKEKG	DRB1*0401	D7
<b>*Pol 325–5</b>	EPFRKQNPDIIVYQY	DRB1*0101	D8 / D18
<b>*Pol 325–8</b>	YQYMDDLIVGSDLEI	DRB1*0405	D17

\*Peptides associated with a lower viral rebound (in bold)

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011.t001>

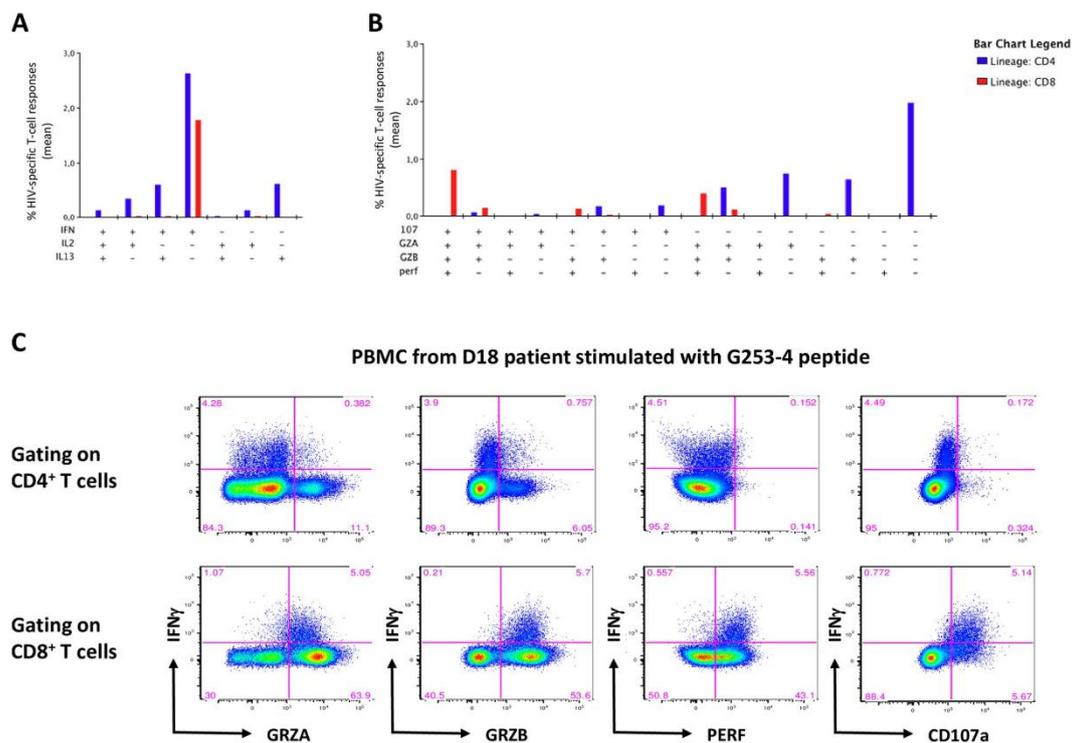
### Characterization of HIV-specific cytokine-producing T cells

Looking at the polyfunctionality of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses induced by vaccination (W16) using ICS, we observed that vaccine-specific T cells were mainly monofunctional IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>IL-13<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and to a lesser extent IL-13<sup>+</sup> (IFN $\gamma$  IL-2<sup>-</sup>)

**Table 2. List of optimal CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes identified.**

Optimal CD8 <sup>+</sup> T-cell epitope	Sequence	Restriction Class I HLA	Patient
Gag 18–27	KIRLRPGGKK	A*0301	D8
		A*0301	D10
Gag 20–28	RLRPGGKKK	A*3001	D4
Gag 21–29	LRPGGKKKY	C*0602	D9
Gag 259–267	GEIYKRWII	B*4001	D7
Gag 260–267	EIYKRWII	B*0801	D19
Nef 66–74	VGFPVTPQV	C*0304	D7
Nef 68–76	FPVTPQVPL	B*3501 / C*0304 / C*0401	D7
Nef 71–79	TPQVPLRPM	B*0702 / B*3501	D10
Nef 73–82	QVPLRPMTYK	A*0301	D10
		A*0301	D17
		A*1101	D19
Nef 83–91	AAVDLSHFL	C*0802 / C*1502	D17
Nef 84–92	AVDLSHFLK	A*1101	D15
		A*1101	D19
Nef 128–137	TPGPGVRYPL	B*0702	D8
Nef 134–141	RYPLTFGW	A*2301	D9
Nef 134–143	RYPLTFGWCY	B*1801	D15
Nef 135–143	YPLTFGWCY	B*3501	D7
		B*3501	D10
Pol 325–333	AIFQSSMTK	A*1101	D19
Pol 327–335	FQSSMTKIL	B*3906 / C*0701 / C*0702	D15
Pol 342–350	NPDIVYQY	B*3501	D7
		B*3508	D5

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011.t002>



**Fig 4. Identification and characterization of cytokine-producing cells by ICS assay.** PBMC from patients (n = 14) collected after vaccination (W16) were stimulated at day 0 with individual 15-mer peptides (previously inducing a positive response in Luminex assay), cultured with rIL-2, and restimulated by the same peptides at day 7. Cytokine production was measured using an ICS assay. (A) Mean % of HIV-specific IFN $\gamma$  and/or IL-2 and/or IL-13 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells to sixteen individual 15-mer HIV-1 peptides. (B) Mean % of cytotoxic marker-expressing cells among cytokine-positive HIV-1-specific CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells to sixteen individual 15-mer HIV-1 peptides. (C) Cytometry dot plots from one representative individual (D18 patient) showing cytotoxic profile of HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after PBMC stimulation with G253-4 peptide.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008011.g004>

CD4<sup>+</sup> T cells. Some CD4<sup>+</sup> T cells were able to produce 2 cytokines (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>IL-13<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells), and only few IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>IL-13<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>IL-13<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were induced by vaccination (Fig 4A). Since cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells have already been described in HIV-1 seropositive patients [23–24], we decided to characterize cytokine-positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells using cytotoxic and degranulation markers such as granzyme A (GRZA), granzyme B (GRZB), perforin (Perf) and CD107a. We observed that CD4<sup>+</sup> T-cells induced by vaccination were mainly non-cytotoxic (CD107a<sup>-</sup>GRZA<sup>-</sup>GRZB<sup>-</sup>Perf<sup>-</sup>), and to a lesser extent able to express GRZA and GRZB or CD107a, but not perforin. Conversely, CD8<sup>+</sup> T cells exhibited mostly a cytotoxic phenotype (CD107a<sup>+</sup>GRZA<sup>+</sup>GRZB<sup>+</sup>Perf<sup>+</sup> and CD107a<sup>-</sup>GRZA<sup>+</sup>GRZB<sup>+</sup>Perf<sup>+</sup>) (Fig 4B). Cytometry dot plots from one representative individual (D18 patient) showing cytotoxic profile of HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with G253-4 peptide after vaccination are represented in Fig 4C.

## Discussion

We report that vaccination with *ex vivo*-generated DCs pulsed with HIV-1 long peptides (HIV-1 lipopeptides) induced and/or expanded HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cells secreting IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13, and also CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN $\gamma$ , perforin and granzymes.

All five HIV-1 peptide regions included in the vaccine induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses. Previous data have shown that these HIV-derived long peptides were enriched in CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes and that lipopeptide vaccination either alone or combined with other agents induced CD8<sup>+</sup> T-cell responses in HIV-negative or HIV-positive individuals [17,19,25]. Interestingly, we previously showed that the DALIA vaccine elicited predominantly IFN $\gamma$ <sup>+</sup> and TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell responses [20], and here we showed that these CD8<sup>+</sup> T cell responses also exhibit cytotoxicity markers, thus indicating a broader functional profile in contrast to those elicited by the administration of HIV-1 lipopeptides alone or in combination with a canarypox vector ALVAC [26]. Interestingly, a comparison of epitopes recognized by vaccine-elicited CD8<sup>+</sup> T cells showed that among the 18 optimal CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes identified in our study, four belongs to the nine most promiscuously presented HIV epitopes described by Frahm and colleagues [27]. To provide global coverage of HIV-1 population diversity, mosaic vaccines containing conserved regions from different HIV-1 clades were developed [28]. It is noteworthy that RMYSPTSI, one of the five Gag conserved epitopes in the IHIVconsvX therapeutic vaccine, which had ability to suppress replication of circulating HIV-1 in HIV-1-infected individuals [29], was present in the DALIA vaccine sequence (Gag 253–284 region). Furthermore, three immunodominant HIV-1 clade B epitopes identified in our study have the ability to be recognized by CD8<sup>+</sup> T cells from CRF02\_AG-infected Ivorian patients [30] and two others were shown to be targeted by CTL from HIV-resistant Kenyan sex workers who had frequent exposure to HIV-1 clades A, C and D [31]. However, it is noteworthy that despite this broad repertoire and a highly cytotoxic phenotype of CD8<sup>+</sup> T-cell responses, we did not observe any association between these responses and the control of HIV replication in patients following ATI. One limitation of our study is the lack of demonstration of the real killing capacity of these cells, which was precluded for technical reasons. Nevertheless, assuming that it is likely that a therapeutic epitope-based vaccine certainly needs to contain different CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes able to bind many different HLA haplotypes, in order to circumvent HIV-1 mutations, our data demonstrate that our DALIA platform is an efficient immunogenic vaccine strategy. Moreover, these data reinforce the need to combine immunotherapeutic strategies along with a vaccine to achieve a functional control of HIV replication.

Our in-depth analysis extended previous results characterizing the HIV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses elicited by the DALIA vaccine. These results are supported by several studies showing that robust HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses are associated with natural control of primary HIV-1 infection [32], predictive of persistent AIDS-free infection [33] and control of viremia in long-term non-progressors [34]. Furthermore, loss of non-progressor status was strongly associated with undetectable or declining Gag p24 CD4<sup>+</sup> T-cell responses [35]. We described an inverse correlation between the breadth and magnitude of vaccine-induced IL-2 responses against individual 15-mer peptides and the maximum of viral load after ATI. The importance of IL-2 production by HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells was already demonstrated, since IL-2 production by HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells was shown to be associated with the persistence of a stable T-cell memory compartment [36], and HIV-specific CD4<sup>+</sup> lymphoproliferative responses were shown to enhance *ex vivo* proliferative activity of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells [37]. Moreover, IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells have been associated with control of viremia in HIV-seropositive patients [38–41], and Lu and colleagues found an inverse correlation between HIV-1 viral load and HIV-1-specific IFN $\gamma$  and IL-2 producing CD4<sup>+</sup> cells after

vaccination of cART naïve HIV-1 individuals with a DC-based therapeutic vaccine pulsed with aldrithiol-2-inactivated HIV-1 [42]. Besides IL-2 responses, we also showed an inverse correlation between the breadth and magnitude of 15-mer peptides-mediated IL-13 responses and the maximum of viral load detected post-ATI. Similarly to the IL-2, we showed that IL-13 was mostly produced by non-cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells. IL-13 is considered a Th2 cytokine and is poorly studied in the HIV field. However, it has recently been shown that HIV-specific Th2 responses could predict HIV vaccine efficacy [43] and that Th2 responses induced after SIV vaccination were correlated with a decrease risk of SIV acquisition [44]. We have already observed IL-13 secretion after vaccination of healthy volunteers with LIPO-5 [45] but to our knowledge, the only other publication studying IL-13 secretion in a therapeutic HIV vaccine context showed an association between higher IL-13 secretion after vaccination and higher viral load after ATI [46]. These discrepancies could be explained by a difference in vaccine composition (Gag/Pol/Nef lipopeptides-loaded activated DCs versus Gag p24 peptides + GM-CSF) and a difference in cytokine measurement protocol (48h stimulation with 15-mer peptides versus 6 days stimulation with recombinant Gag p24). In line with our results, it has been demonstrated that IL-13 inhibited HIV production in primary blood-derived human macrophages *in vitro* [47] and that IL-13 and IFN $\gamma$  secretion by activated T cells in HIV-1 infection was associated with viral suppression and a lack of disease progression [48]. Moreover, IL-13 was shown to increase HIV-specific and recall responses from HIV-1-infected subjects *in vitro* by modulating monocytes [49]. Last but not least, IL-13 was also shown to be produced by seronegative subjects highly exposed to HIV [50].

All five HIV-1 lipopeptide sequences used to load the DALIA vaccine, in particular Gag 253–284 and Pol 325–355 regions, induced strong CD4<sup>+</sup> T-cell responses. Accordingly, these five HIV regions were shown to induce CD4<sup>+</sup> T-cell responses in non-HIV (19) or HIV-infected patients [25] vaccinated with HIV-1 lipopeptides, and some epitopes contained in these vaccine regions were previously described as present in a set of 11 immunogenic HLA-DR supertype CD4<sup>+</sup> epitopes [51] or 31 immunodominant CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes [52]. We extended this repertoire by identification of 6 immunodominant 15-mer peptides elicited after DALIA vaccination: Gag17-2 (EKIRLRPGGKKKYKL), Gag253-3 (PVGEIYKRWILGLN), Gag253-4 (IYKRWILGLNKIVR), Gag253-5 (WILGLKNIVRMYSY), Gag253-6 (GLNKIVRMYSYTSIL) and Pol325-5 (EPFRKQNPDIVIYQY). The first five were already described as CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes [53] and listed in the HIV molecular immunology database ([http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/helper\\_summary.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/helper_summary.html)). Gag253-3, Gag253-4, Gag253-5 and Gag253-6 have been described as DRB1\*04:01 restricted epitopes in a study using HLA DR4 transgenic mice [54]. Gag253-4, Gag253-5 and Gag253-6 were also found to be promiscuous peptides, i.e. able to bind multiple HLA-DR alleles, using NetMHCIIpan 3.2, the server we used to predict binding of 15-mer peptides to HLA Class II DRB1 alleles. Pol325-5 was not listed in the HIV molecular immunology database, nonetheless it is nearly totally contained (93% overlap) in a Pol CD4<sup>+</sup> T-cell promiscuous epitope identified by van der Burg and colleagues [55]. Of note, in some studies where the breadth of Gag-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses was shown to be associated with lower viral load in HIV-infected individuals [56–58], Gag17-4, Gag253-4, Gag253-5, Gag253-6 and Gag253-7 were the main targeted epitopes. HIV-1 Nef-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses are also important to control HIV-1 viral load and the Nef 66–97 peptide included in the DALIA vaccine was found among the 4 Nef epitopes previously associated with non-progression in HIV-1 infection [59]. In our study, we found that responses to seventeen 15-mer peptides of interest were potentially associated with lower viral load after ATI. Among them, Gag253-4 and Nef66-6 CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes were found in the studies mentioned above. All these data suggest that Gag253-4 is probably the most important HIV-1 sequence to be included in a therapeutic vaccine, and this is

strengthened by its large capacity to bind to the 20 most frequent HLA-DRB1 alleles in the world population [60].

To study the reliability of the epitope prediction servers used in our study, we first looked whether the observed responses were predicted. Among the 117 cytokine-positive CD4<sup>+</sup> T-cell responses detected in our study, only 35% were predicted to bind DRB1 molecules by NetMHCIIpan 3.2 server, but it is difficult to comment on the reliability of NetMHCIIpan 3.2 server because we only used HLA-DRB1 (and not HLA-DP or -DQ) molecules of the patients for epitope prediction with this server. By contrast, all 46 observed CD8<sup>+</sup> T-cell responses were predicted to bind HLA class I A, B or C molecules of the patients by NetMHCpan 4.0 server. Then we looked whether the predicted responses were actually observed. Interestingly, only 10% of all predicted CD8<sup>+</sup> T-cell responses were observed. A potential explanation could be that even the servers used in this study predict binding affinity of peptides to MHC molecules, affinity is only one of the determinant factors for a peptide to induce an immune response. Indeed, to be immunogenic, a peptide needs to be efficiently processed by the cell machinery and then presented by MHC molecules. Epitope flanking residues can influence the proteasome or peptidase processing of the antigen. TCR affinity for the peptide/MHC complex also has an important role on the induction of immune responses. For CD4<sup>+</sup> T-cell responses, 51% of predicted responses were observed and we found 3 different patterns: 1) some peptides were predicted to bind HLA-DR molecules frequently expressed by the patients and for those we observed the majority of CD4<sup>+</sup> T-cell responses (this was the case for Gag253-4/5/6); 2) some peptides were predicted to bind HLA-DR frequently expressed by the patients and for those we observed only few CD4<sup>+</sup> T-cell responses (this was the case for Gag17-4, Gag253-7 and Pol325-1/2); 3) some peptides were not predicted to bind HLA-DR molecules expressed by the patients, but for those we nevertheless observed a CD4<sup>+</sup> T-cell responses (this was the case for Gag253-3, Nef66-4 and Pol325-4/5). This latter result could easily be explained by the fact that these peptides could bind HLA-DP or -DQ alleles. However, another explanation could be that HIV-1 regions that bind some HLA class II alleles very weakly can induce CD4<sup>+</sup> T-cell responses, and this is actually the case for the HIV-1 lipopeptides used in the DALIA vaccine, for which the hierarchy of CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes relies on the frequency of pre-existing peptide-specific T cells in healthy donors [61].

Recently, an association of HLA-DRB1 allele expression with HIV viral load profiles at a population level was reported [62]. DRB1\*15:02 was shown to be associated with HIV control whereas DRB1\*03:01 was shown to be associated with HIV progression. Here, we identified using a modified ICS protocol with single HLA DRB1 transfected cell lines as APC, in vaccinated patients, 8 new HLA-DR CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes restricted by different HLA-DRB1 alleles. Among them, Gag17-2 was restricted by DRB1\*03:01. Although, in our study, due to the small number of patients, we could not find any effect of these two HLA-DRB1 alleles on viral load dynamics after ATI, prediction analysis revealed that only two epitopes Gag253-4 and Gag253-5 could bind the DRB1\*03:01 allele while Gag253-4, Gag253-5, Gag253-6, Gag253-7, Pol325-1, Pol325-2 and Pol325-7 could bind the “protective” DRB1\*15:02 allele.

Our study has characterized epitope responses to a therapeutic HIV-1 vaccine beyond the “classical” analyses of responses to global HIV peptide pools. Our analysis benefited from the well described definition of HIV-1 peptides used for loading of the DC vaccine. This originality represents an advantage compared to similar studies using chemically or temperature inactivated whole autologous HIV or RNA-based pulsed DCs [42,63,64]. Regarding the need to significantly improve the breadth and the functionality of vaccine responses with the aim to better control HIV in the perspective of functional HIV cure, it is key to better identify the epitopes of interest. In contrast to several studies of these responses in natural infection, fine characterization of vaccine response at the level of individual peptides contained in therapeutic

vaccine is lacking. We confirmed at the epitope level that the DALIA vaccine regimen induced CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell responses, and that IL-2 and IL-13 responses induced by the vaccine were mediated by CD4<sup>+</sup> T cells. Beyond the dissection of precise epitopes, we described an inverse correlation between the breadth and magnitude of peculiar CD4<sup>+</sup> T-cell responses producing IL-2 and/or IL-13 and a partial control of viral load after ATI.

From a clinical stand point, these results may help to better design the future planned DC therapeutic vaccine trial. First, it is likely that a combined strategy to complement CD8<sup>+</sup> T-cell responses (immune checkpoint blockers, cytokines such as IL-7 or IL-15) to CD4<sup>+</sup> elicited T-cell responses is warranted. Second, a particular attention will be paid to IL-2 and IL-13 CD4<sup>+</sup> T-cell responses in relation to viral load dynamics after ATI. Since DC-based vaccines are difficult to make and will be challenging to use on a large scale, a new generation of vaccines targeting DC *in vivo* was developed using monoclonal antibodies directed against cell-surface receptors [65]. Thus, the sequences of the 5 lipopeptides used in the DALIA vaccine were recently fused with an anti-human CD40 antibody to target DCs *in vivo*. Targeting DC of HIV-1 infected patients *in vitro* with this new candidate vaccine ( $\alpha$ CD40.HIV5pep) showed induction of CD4<sup>+</sup> T-cell responses towards Gag 253–284 and Pol 325–355 regions in a majority of patients [66]. Safety and immunogenicity of this vaccine construct administered intradermally with poly-ICLC was recently demonstrated in rhesus macaques [67]. Moreover, in humanized mice infected with HIV-1 and treated with antiviral drugs,  $\alpha$ CD40.HIV5pep plus poly-ICLC vaccination rescued HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses and reduced the size of the HIV-1 reservoir, leading to significant control of HIV-1 rebound after cART interruption [68]. Thus, either *ex vivo* (DALIA) and *in vivo* (anti-CD40.HIV5pep) DC-targeting platforms are promising immune interventions to combine with cytokines, immune checkpoint inhibitors, as well as broad neutralizing antibodies for an HIV cure [69].

## Materials and methods

### Study design and vaccine preparation

The ANRS/VRI DALIA was a phase I single-center single-arm clinical trial (North Texas Infectious Diseases Consultants, Dallas, TX) sponsored by Baylor Institute for Immunology Research and the French Agency INSERM-Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites (INSERM-ANRS). Eligible participants were asymptomatic HIV-1-infected adults with CD4<sup>+</sup> T cell counts >500 cells/ $\mu$ L and  $\geq$ 25% of total lymphocytes, CD4 nadir  $\geq$ 300 cells/ $\mu$ L, and no history of AIDS-defining events. Participants had to be on combination antiretroviral therapy (cART) with plasma HIV RNA <50 copies/mL at screening and within the previous 3 months. Participants received four vaccinations at weeks (W) 0, 4, 8 and 12 while on cART. Participants who had HIV-1 RNA <400 copies/mL at W22 were proposed to interrupt cART at W24 until W48. Flowchart describing the ANRS/VRI DALIA clinical trial, as well as baseline characteristics of the patients, have been reported previously [20] and design of the DALIA trial is shown in S1 Fig. Twenty participants were screened and 19 enrolled in the trial between 2009 and 2010. Among these 19 participants, three were not included in the present analyses due to lack of cryopreserved PBMCs to perform T-cell assays.

Blood monocytes from each patient were obtained from an apheresis at W-4 while on cART. DC-based vaccines were generated by culturing blood monocytes with GM-CSF and IFN $\alpha$  for three days. Differentiating DCs were then pulsed for 24 hours with lipopeptides (ANRS HIV-LIPO-5): HIV-1 LAI (clade B) Gag 17–35, Gag 253–284, Pol 325–355, Nef 66–97 and Nef 116–145, activated during the last 6 hours with lipopolysaccharide (LPS), purified under Good Manufacturing Practice guidelines, harvested and then frozen. Preclinical validation of the preparation and functional characterization of this vaccine has been previously

reported [16]. Approximately  $15 \times 10^6$  viable frozen-thawed HIV lipopeptide-loaded DC were injected subcutaneously in 3 separate injection sites (3.3 ml per site) in the upper and lower extremities at each vaccination time point.

### Ethics statement

The trial was approved by the IRB of Baylor Research Institute (BRI) and registered on ClinicalTrials.gov (NCT00796770). All participants provided written informed consent.

### HLA typing

Samples were sent to LABS Inc (Centennial CO, USA) for HLA Typing (A, B, C, DRB1 and DQB1) using High Resolution Sequence Based Testing (SBT). HLA characteristics of participants (A, B, and C for HLA class I and DRB1 for HLA class II) are reported in [S4 Table](#).

### Peptides used in T-cell assays

Fifteen-mer peptides ( $n = 36$ ) overlapping by 11 amino acids (aa) and covering the vaccine sequences were synthesized by Biosynthesis (Lewisville, TX, USA) and used at a final concentration of  $2 \mu\text{M}$  (sequences are listed in [S1 Table](#)). Eight- to ten-mer peptides synthesized by NeoMPS (now PolyPeptide Laboratories France, Strasbourg) were used at  $2 \mu\text{g/ml}$  to identify optimal  $\text{CD8}^+$  T-cell epitopes.

### Prediction of $\text{CD4}^+$ and $\text{CD8}^+$ T-cell epitopes

NetMHCIIpan 3.2 [21] server was used to predict binding of peptides to MHC class-II DRB1 molecules of the participants and their putative  $\text{CD4}^+$  T-cell responses. NetMHCpan 4.0 [22] was used to predict binding of peptides to MHC class-I (A, B and C) molecules of the participants and potential  $\text{CD8}^+$  T-cell epitopes. These prediction methods are based on ANN. For NetMHCIIpan 3.2, the prediction values are given in  $\text{IC}_{50}$  values (in nM) and as %Rank. The percentile rank for a peptide is generated by comparing its score against the scores of 200,000 random natural peptides of the same length of the query peptide. Strong and weak binding peptides are identified based on %Rank, with customizable thresholds. We applied the default thresholds of 2% and 10% for strong and weak binders, respectively. For NetMHCpan 4.0, the method is trained on a combination of more than 180,000 quantitative binding data and mass spectrometry derived MHC eluted ligands. Rank of the predicted affinity was compared to a set of random natural peptides. The peptide will be identified as a strong binder if the % Rank is below the specified threshold for the strong binders, by default 0.5%. The peptide will be identified as a weak binder if the % Rank is above the threshold of the strong binders but below the specified threshold for the weak binders, by default 2%.

### Luminex assay

Frozen PBMCs from aphereses before (W-4) and after (W16) vaccination were thawed and rested at  $37^\circ\text{C}$  for 1h. Samples were filtered and resuspended in RPMI 1640 media supplemented with 10% Human serum (HS). Plates containing individual overlapping peptides, positive (Staphylococcal enterotoxin B (SEB)) and negative (no peptide) controls, were thawed at room temperature and  $1 \times 10^6$  cells were added in each well to a final volume of 300  $\mu\text{l}$ . After 48h of culture, the plates were centrifuged, and 200  $\mu\text{l}$  of each supernatant was collected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for cytokine detection. Measurements and analyses of secreted IL-2, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21,  $\text{IFN}\gamma$  and IP10 (expressed in fluorescence intensity (FI) and concentration) were performed using an "in house" multiplex bead-based technology (Luminex) assay with a

Bio-Plex 200 instrument (Bio-Rad) after a two-fold dilution of supernatants. Human IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21 and IP-10 monoclonal antibody reagent pairs were developed and validated by the Baylor Institute for Immunology Research (BIIR). These pairs were conjugated to Luminex X-MAP SeroMAP microspheres according to manufacturer's guidelines (Luminex). Biotinylation was performed with EZ link Sulfo-NHS LC Biotin from Thermo Fisher. PhycoLink Streptavidin-RPE was purchased from Prozyme. This multiplex was assessed using a commercial 68-Plex cytokine standard cocktail produced expressly for the BIIR by BioLegend with protocols comparable to that for Millipore multiplex processing. The BIIR Luminex Core facility maintains compliance with the External Quality Assurance Program Oversight Laboratory, a National Institutes of Health and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Division of AIDS program for quality assessment review and ratings of laboratories involved in HIV/AIDS research and vaccine trials around the world.

### Intracellular Cytokine Staining (ICS)

Frozen PBMC from the apheresis at W16 were thawed and rested at 37°C for 3h in RPMI 1640 media with L-Glutamax supplemented with Penicillin / Streptomycin and 10% HIS (R-10HIS). On day 0 (D0),  $2 \times 10^6$  cells were cultured in 24 flat bottom wells culture plate with or without 2  $\mu$ M of 15-mer peptides that induced a positive response by Luminex assay. IL-2 (10 U/ml) was added on day 2 and half of the volume of each culture well was refreshed with fresh media containing IL-2 (10 U/ml) at day 4. On day 7 the cells were divided in two 5 ml polypropylene tubes and washed two times. D0 non-stimulated cells were then stimulated or not with SEB, and D0 stimulated cells were re-stimulated or not with the same peptide as D0, in a 500  $\mu$ l R-10HS final volume. For the cytotoxic panel, CD107a was also added during cell stimulation. One hour later, BD GolgiPlug and GolgiStop (Becton Dickinson France) were added and the culture was continued for additional 5 hours. Cells were then washed and stained for surface antibodies and live/dead marker for 20 minutes. Following fixation and permeabilization, cells were stained with intracellular antibodies for 30 minutes. Cells were then washed and resuspended in 250  $\mu$ l PBS 1% PFA.

To determine optimal CD8 responses, predicted CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes (8- to 10-mers) were used in ICS assay.

To determine the DRB1 HLA molecules involved in the observed CD4<sup>+</sup> T-cell responses, 14 different DRB1 (DRB1\*01:01, 03:01, 04:01, 04:02, 04:03, 04:04, 04:05, 07:01, 11:01, 11:04, 13:01, 13:02, 14:01, 15:01) single transfected DAP.3 cell lines (LJI, USA) were pulsed for 1h with 15-mer peptides, washed four times and then added at D7 to D0-stimulated cells. Non-transfected DAP.3 cell line was used as negative control.

Two different ICS panels were tested, a first one for cytokine responses using anti-CD3 A700 (BD ref 557943), -CD4 BV605 (BD ref 562658), -CD8 efluor780 (eBioscience ref 9047-0087-120), -CD56 PECF594 (BD ref 564849), -IL-13 PE (BD ref 340508), -IFN $\gamma$  PerCPCy5.5 (BD ref 560704), -IL-2 FITC (BD ref 559361), -IL-21 AF647 (BD ref 560493), Live dead fixable Aqua Dead (Life Technologies ref L34957), and a second for cytotoxic characterization of cytokine responses using anti-CD3 BV605 (Biolegend ref 300460), -CD4 BV785 (Biolegend ref 300554), -CD8 APC-II7 (BD ref 560179), -CD56 PC7 (BD ref 557747), -IL-13 PE (BD ref 340508), -IFN $\gamma$  PECF594 (BD ref 562392), -IL-2 APC (eBioscience ref 17-7029-41), -Granzyme A Pacific Blue (Biolegend ref 507207), -Granzyme B AF700 (BD ref 560213), -Perforin PerCPCy5.5 (Biolegend ref 353314), -CD107a FITC (BD ref 555800), Live dead fixable Aqua Dead (Life Technologies ref L34957).

Samples were analyzed with a BD LSRII and data were acquired with DIVA software. FlowJo 9.9.6 (TreeStar, Inc., Ashland, OR), Pestle 1.7 and Spice 5.35 (M. Roederer, National Institute of Health) softwares were used for data analysis.

### Statistical analyses

For a given cytokine, a Luminex quantification was considered as a positive response if the fluorescence intensity (FI) was  $> 90^{\text{th}}$  percentile of all negative controls (non-stimulated cells before and after vaccination for all participants) and  $> 3$  times the background (median of three negative control wells for the considered participant and time point). An ICS response was considered positive for a given cytokine if the frequency of stimulated  $\text{CD}3^+\text{CD}56^+\text{CD}4^+$  or  $\text{CD}3^+\text{CD}56^+\text{CD}8^+$  cells was  $> 3$  times the negative control (unstimulated cells) and  $> 0.05\%$ .

Correlations between immunogenicity outcome at W16 and the maximum of HIV-1 RNA observed during ATI were analyzed by Spearman rank correlations. Comparison between frequency of responders before and after vaccination was performed using McNemar's test and comparison between the breadth of the response observed before and after vaccination was performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism (version 8.0.1, GraphPad Software, San Diego, USA).

### Supporting information

**S1 Fig. Design of the DALIA trial.** HIV-infected patients have been vaccinated at 0, 4, 8, 12 weeks and antiretroviral treatments have been interrupted at 24 weeks. Apheresis has been performed at 2 to 4 weeks ( $-2/-4$ ) before the first vaccine injection (week 0), and 16 weeks and 48 weeks thereafter. Blood draw has been performed at each single visit. Of 20 eligible HIV-infected patients, 19 completed the vaccination and 16 reached the 48 weeks visit without resuming their antiretroviral treatment after interrupting it at 24 weeks.  
(TIF)

**S2 Fig. Magnitude of  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses at W-4.** Magnitude (FI) of  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses (median) quantified by Luminex assay after a 48h stimulation of PBMC with individual peptides. Dotted line represents the strong responses threshold defined in Fig 2A.  
(TIF)

**S3 Fig. Magnitude of  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses for controls at W16.** Magnitude (FI) of  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses (median) quantified by Luminex assay after a 48h stimulation of PBMC with medium alone (3 wells of non-stimulated cells), 3 non-LIPO-5 peptide pools from Gag p2p6 protein, or SEB. Dotted line represents the strong responses threshold defined in Fig 2A.  
(TIF)

**S4 Fig. Predicted versus Observed T-cell responses.** (A)  $\text{CD}4^+$  T-cell responses according to NetMHCIIpan 3.2 HLA-DRB1-binding predicted 15-mer peptides (blue line) or observed after 7-day ICS (green bars) for the 14 patients tested at W16. (B)  $\text{CD}8^+$  T-cell responses according to NetMHCpan 4.0 HLA-A/B/C-binding predicted 15-mer peptides (blue line) or observed after 7-day ICS (orange bars) for the 14 patients tested at W16.  
(TIF)

**S1 Table. Peptide sequences.**  
(TIF)

**S2 Table. Individual data of  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 and IL-13 concentration level (pg/ml) at W16.** Luminex assay was performed after a 48h stimulation of PBMC with 36 individual 15-mer peptides. Absence of data means  $< \text{LLOQ}$  (lower limit of quantification). Positive responses

identified using our positivity cut off based on FI are highlighted in yellow.  
(XLSX)

**S3 Table. Identification of the HLA-DR molecules involved in the CD4<sup>+</sup> T-cell responses using HLA-DRB1-transfected cell lines.** PBMC were stimulated at day 0 with individual 15-mer peptides and cultured during 7 days with rIL-2. ICS assay was performed at day 7 after a 6h restimulation with 15-mer peptides or with HLA-DRB1-transfected cell lines previously pulsed (P) 1 hour with the 15-mer peptides. Non-restimulated PBMC, untransfected DAP.3 cell line pulsed 1 hour with the 15-mer peptides, and HLA-DRB1-transfected cell lines not pulsed (NP) with the 15-mer peptides were used as negative controls. An ICS response was considered positive (highlighted in bold in the table) if the frequency of stimulated CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells were > 3-fold the unstimulated cells and > 0.05%. Positive responses not predicted by NetMHCIIpan 3.2 are highlighted in yellow.  
(XLSX)

**S4 Table. HLA characteristics of participants.**  
(TIF)

### Acknowledgments

The authors wish to thank all participants of the DALIA trial and the members of the trial committees and of the ANRS/VRI study team.

DSMB members: William Duncan, Roy M. Gulick, Daniel R. Kuritzkes, James Neaton, Richard Pollard (Chair).

Event Validation Committee members: Joseph Fay, Ronald Mitsuyasu, Jean-Paul Viard.

Trial management: Derek Blankenship, Céline Boucherie, Carson Harrod, David Jutras, Bryan King, Christine Lacabaratz, Sophie Pérusat, Elisa Priest, Charlie Quinn, Anna Laura Ross, Louis Sloan.

Vaccine/GMP team: Susan Burkeholder, Amanda Cobb, Charles McWilliams, Jennifer Finholt-Perry, Lee Roberts.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Jean-Daniel Lelièvre, Christine Lacabaratz, Yves Lévy.

**Formal analysis:** Mathieu Surenaud.

**Methodology:** Mathieu Surenaud, Monica Montes.

**Resources:** Cecilia S. Lindestam Arlehamn, Alessandro Sette.

**Supervision:** Jean-Daniel Lelièvre, Christine Lacabaratz, Yves Lévy.

**Validation:** Mathieu Surenaud, Jean-Daniel Lelièvre, Christine Lacabaratz, Yves Lévy.

**Writing – original draft:** Mathieu Surenaud.

**Writing – review & editing:** Mathieu Surenaud, Cecilia S. Lindestam Arlehamn, Alessandro Sette, Jacques Banchereau, Karolina Palucka, Jean-Daniel Lelièvre, Christine Lacabaratz, Yves Lévy.

### References

1. UNAIDS Global HIV & AIDS statistics—2018 fact sheet. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>

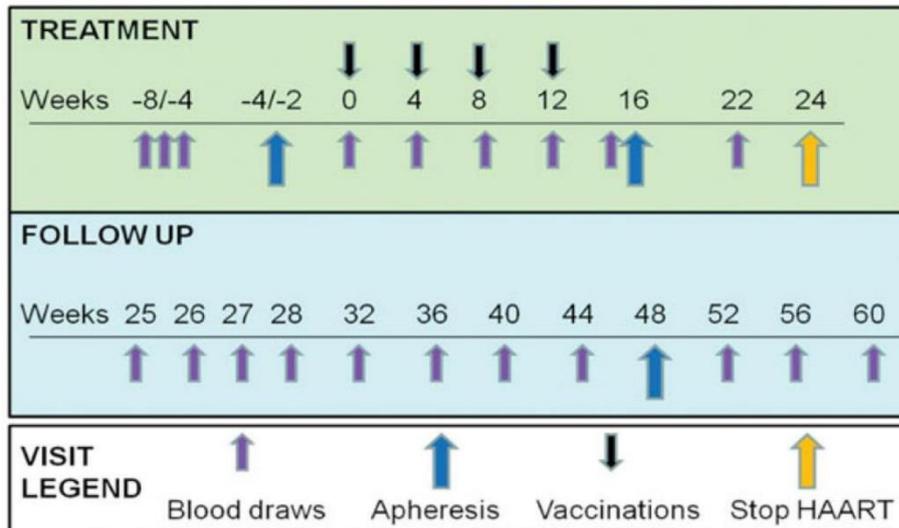
2. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1998; 338(13):853–860. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803263381301> PMID: 9516219
3. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 2011; 365(6):493–505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105243> PMID: 21767103
4. Troya J, Bascuñana J. Safety and Tolerability: Current Challenges to Antiretroviral Therapy for the Long-Term Management of HIV Infection. *AIDS Rev*. 2016; 18(3):127–137. PMID: 27651173
5. Nachega JB, Marconi VC, van Zyl GU, Gardner EM, Preiser W, Hong SY, et al. HIV treatment adherence, drug resistance, virologic failure: evolving concepts. *Infect Disord Drug Targets*. 2011; 11(2):167–174. PMID: 21406048
6. Schouten J, Wit FW, Stolte IG, Kootstra NA, van der Valk M, Geerlings SE, et al. Cross-sectional comparison of the prevalence of age-associated comorbidities and their risk factors between HIV-infected and uninfected individuals: the AGE<sub>HIV</sub> cohort study. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(12):1787–1797. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu701> PMID: 25182245
7. Legarth RA, Ahlström MG, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen C, Pedersen G, et al. Long-Term Mortality in HIV-Infected Individuals 50 Years or Older: A Nationwide, Population-Based Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 71(2):213–218. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000825> PMID: 26334734
8. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997; 278(5341):1295–1300. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1295> PMID: 9360927
9. García F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS*. 1999; 13(11):F79–86. <https://doi.org/10.1097/00002030-199907300-00002> PMID: 10449278
10. Peters BS. The basis for HIV immunotherapeutic vaccines. *Vaccine*. 2001; 20(5–6):688–705. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00394-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00394-2) PMID: 11738732
11. Engelhard VH. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6(1):13–23. PMID: 7513522
12. Rötzschke O, Falk K. Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6(1):45–51. PMID: 7513525
13. He D, Kunwar P, Eskin E, Horton H, Gilbert P, Hertz T. Using HLA binding prediction algorithms for epitope mapping in HIV vaccine clinical trials. *BCB '11 Proceedings of the 2nd ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine*, Chicago, Illinois—August 01–03, 2011. pp. 594–601.
14. da Silva LT, Santillo BT, de Almeida A, Duarte AJDS, Oshiro TM. Using Dendritic Cell-based immunotherapy to treat HIV: How can this strategy be improved? *Front Immunol*. 2018; 9:2993. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02993> PMID: 30619346
15. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392(6673):245–252. <https://doi.org/10.1038/32588> PMID: 9521319
16. Cobb A, Roberts LK, Palucka AK, Mead H, Montes M, Ranganathan R, et al. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine. *J Immunol Methods*. 2011; 365(1–2):27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.11.002> PMID: 21093448
17. Gahéry-Ségard H, Pialoux G, Figueiredo S, Igéa C, Surenaud M, Gaston J, et al. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8<sup>+</sup>-T-cell epitopes recognized. *J Virol*. 2003; 77(20):11220–11231. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11220-11231.2003> PMID: 14512570
18. Gahery H, Figueiredo S, Texier C, Pouvelle-Moratille S, Ourth L, Igéa C, et al. HLA-DR-restricted peptides identified in the Nef protein can induce HIV type 1-specific IL-2/IFN-gamma-secreting CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells in humans after lipopeptide vaccination. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23(3):427–437. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.0075> PMID: 17411376
19. Salmon-Céron D, Durier C, Desaint C, Cuzin L, Surenaud M, Hamouda NB, et al. Immunogenicity and safety of an HIV-1 lipopeptide vaccine in healthy adults: a phase 2 placebo-controlled ANRS trial. *AIDS*. 2010; 24(14):2211–2223. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833ce566> PMID: 20625264
20. Lévy Y, Thiébaud R, Montes M, Lacabaratz C, Sloan L, King B, et al. Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. *Eur J Immunol*. 2014; 44(9):2802–2810. <https://doi.org/10.1002/eji.201344433> PMID: 25042008
21. Jensen KK, Andreatta M, Marcatili P, Buus S, Greenbaum JA, Yan Z, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*. 2018; 154(3):394–406. <https://doi.org/10.1111/imm.12889> PMID: 29315598

22. Jurtz V, Paul S, Andreatta M, Marcatili P, Peters B, Nielsen M. NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J Immunol*. 2017; 199(9):3360–3368. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700893> PMID: 28978689
23. Nemes E, Bertonecchi L, Lugli E, Pinti M, Nasi M, Manzini L, et al. Cytotoxic granule release dominates gag-specific CD4+ T-cell response in different phases of HIV infection. *AIDS*. 2010; 24(7):947–957. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328337b144> PMID: 20179574
24. Soghian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, et al. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med*. 2012; 4(123):123ra25. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003165> PMID: 22378925
25. Lévy Y, Gahéry-Ségard H, Durier C, Lascaux AS, Goujard C, Meiffredy V, et al. Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *AIDS*. 2005; 19(3):279–286. PMID: 15718838
26. Figueiredo S, Charmeteau B, Surenaud M, Salmon D, Launay O, Guillet JG, et al. Memory CD8(+) T cells elicited by HIV-1 lipopeptide vaccines display similar phenotypic profiles but differences in term of magnitude and multifunctionality compared with FLU- or EBV-specific memory T cells in humans. *Vaccine*. 2014; 32(4):492–501. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.052> PMID: 24291199
27. Frahm N, Yusim K, Suscovich TJ, Adams S, Sidney J, Hraber P, et al. Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. *Eur J Immunol*. 2007; 37(9):2419–2433. <https://doi.org/10.1002/eji.200737365> PMID: 17705138
28. Létourneau S, Im EJ, Mashishi T, Brereton C, Bridgeman A, Yang H, et al. Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS One*. 2007; 2(10):e984. <https://doi.org/10.1371/annotation/fca26a4f-42c1-4772-a19e-aa9d96c4eeb2> PMID: 17912361
29. Murakoshi H, Zou C, Kuse N, Akahoshi T, Chikata T, Gatanaga H, et al. CD8+ T cells specific for conserved, cross-reactive Gag epitopes with strong ability to suppress HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2018; 15(1):46. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0429-y> PMID: 29970102
30. Inwoley A, Recordon-Pinson P, Dupuis M, Gaston J, Genête M, Minga A, et al. Cross-clade conservation of HIV type 1 Nef immunodominant regions recognized by CD8+ T cells of HIV type 1 CRF02\_AG-infected Ivorian (West Africa). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005; 21(7):620–628. <https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.620> PMID: 16060833
31. Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest*. 1998; 102(9):1758–1765. <https://doi.org/10.1172/JCI4314> PMID: 9802890
32. Gloster SE, Newton P, Cornforth D, Lifson JD, Williams I, Shaw GM, et al. Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *AIDS*. 2004; 18(5):749–755. <https://doi.org/10.1097/00002030-200403260-00005> PMID: 15075509
33. Pontesilli O, Carotenuto P, Kerkhof-Garde SR, Roos MT, Keet IP, Coutinho RA, et al. Lymphoproliferative response to HIV type 1 p24 in long-term survivors of HIV type 1 infection is predictive of persistent AIDS-free infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999; 15(11):973–981. <https://doi.org/10.1089/088922299310485> PMID: 10445809
34. Rosenberg ES, Billingsley JM, Calliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalam SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997; 278(5342):1447–1450. <https://doi.org/10.1126/science.278.5342.1447> PMID: 9367954
35. Dyer WB, Zaunders JJ, Yuan FF, Wang B, Learmont JC, Geczy AF, et al. Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2008; 5:112. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-112> PMID: 19077215
36. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, Routy JP, et al. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*. 2003; 198(12):1909–1922. <https://doi.org/10.1084/jem.20031598> PMID: 14676302
37. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2004; 200(6):701–712. <https://doi.org/10.1084/jem.20041270> PMID: 15381726
38. Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma-IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol*. 2002; 169(11):6376–6385. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6376> PMID: 12444145
39. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after

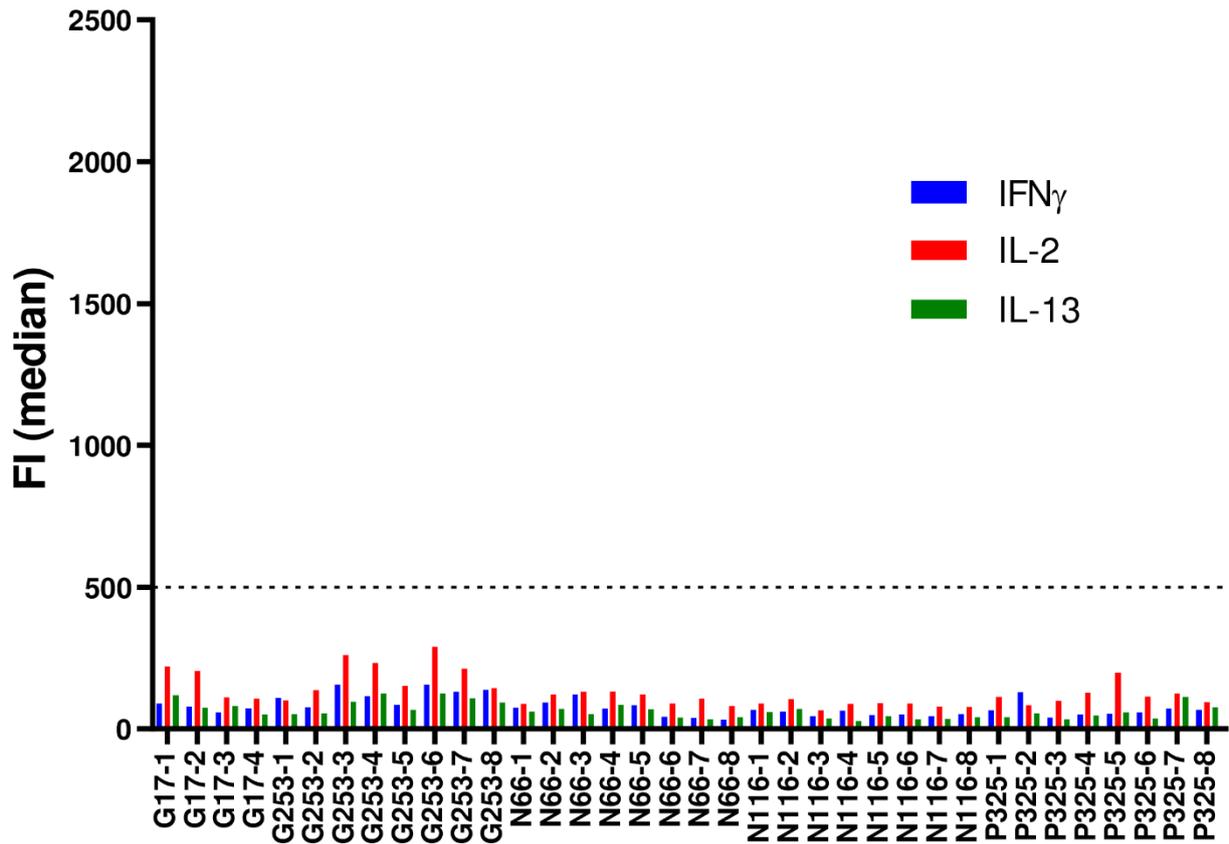
- antiretroviral therapy. *Blood*. 2004; 103(3):966–972. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1203> PMID: 12958069
40. Emu B, Sinclair E, Favre D, Moretto WJ, Hsue P, Hoh R, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol*. 2005; 79(22):14169–14178. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14169-14178.2005> PMID: 16254352
  41. Potter SJ, Lacabaratz C, Lambotte O, Perez-Patrigeon S, Vingert B, Sinet M, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol*. 2007; 81(24):13904–13915. <https://doi.org/10.1128/JVI.01401-07> PMID: 17928341
  42. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med*. 2004; 10(12):1359–1365. <https://doi.org/10.1038/nm1147> PMID: 15568033
  43. Sauce D, Gorochov G, Larsen M. HIV-specific Th2 and Th17 responses predict HIV vaccine protection efficacy. *Sci Rep*. 2016; 6:28129. <https://doi.org/10.1038/srep28129> PMID: 27324186
  44. Vaccari M, Fourati S, Gordon SN, Brown DR, Bissa M, Schifanella L, et al. HIV vaccine candidate activation of hypoxia and the inflammasome in CD14+ monocytes is associated with a decreased risk of SIVmac251 acquisition. *Nat Med*. 2018; 24(6):847–856. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0025-7> PMID: 29785023
  45. Richert L, Hue S, Hocini H, Raimbault M, Lacabaratz C, Surenaud M, et al. Cytokine and gene transcription profiles of immune responses elicited by HIV lipopeptide vaccine in HIV-negative volunteers. *AIDS*. 2013; 27(9):1421–1431. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835f5b60> PMID: 23759749
  46. Huang Y, Pantaleo G, Tapia G, Sanchez B, Zhang L, Trondsen M, et al. Cell-Mediated Immune Predictors of Vaccine Effect on Viral Load and CD4 Count in a Phase 2 Therapeutic HIV-1 Vaccine Clinical Trial. *EBioMedicine*. 2017; 24:195–204. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.028> PMID: 28970080
  47. Montaner LJ, Doyle AG, Collin M, Herbein G, Illei P, James W, et al. Interleukin 13 inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in primary blood-derived human macrophages in vitro. *J Exp Med*. 1993; 178(2):743–747. <https://doi.org/10.1084/jem.178.2.743> PMID: 8101865
  48. Bailer RT, Holloway A, Sun J, Margolick JB, Martin M, Kostman J, et al. IL-13 and IFN-gamma secretion by activated T cells in HIV-1 infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. *J Immunol*. 1999; 162(12):7534–7542. PMID: 10358209
  49. Papasavvas E, Sun J, Luo Q, Moore EC, Thiel B, MacGregor RR, et al. IL-13 acutely augments HIV-specific and recall responses from HIV-1-infected subjects in vitro by modulating monocytes. *J Immunol*. 2005; 175(8):5532–5540. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5532> PMID: 16210662
  50. Ruiz-Riol M, Llano A, Ibarrondo J, Zamarreño J, Yusim K, Bach V, et al. Alternative effector-function profiling identifies broad HIV-specific T-cell responses in highly HIV-exposed individuals who remain uninfected. *J Infect Dis*. 2015; 211(6):936–946. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu534> PMID: 25249264
  51. Wilson CC, Palmer B, Southwood S, Sidney J, Higashimoto Y, Appella E, et al. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol*. 2001; 75(9):4195–4207. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4195-4207.2001> PMID: 11287569
  52. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, et al. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol*. 2004; 78(9):4463–4477. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4463-4477.2004> PMID: 15078927
  53. Koeppe JR, Campbell TB, Rapaport EL, Wilson CC. HIV-1-specific CD4+ T-cell responses are not associated with significant viral epitope variation in persons with persistent plasma viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 41(2):140–148. PMID: 16394844
  54. Simon GG, Hu Y, Khan AM, Zhou J, Salmon J, Chikhlikar PR, et al. Dendritic cell mediated delivery of plasmid DNA encoding LAMP/HIV-1 Gag fusion immunogen enhances T cell epitope responses in HLA DR4 transgenic mice. *PLoS One*. 2010; 5(1):e8574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088574> PMID: 20052293
  55. van der Burg SH, Kwappenberg KM, Geluk A, van der Kruk M, Pontesilli O, Hovenkamp E, et al. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J Immunol*. 1999; 162(1):152–160. PMID: 9886381
  56. Ranasinghe S, Flanders M, Cutler S, Soghoian DZ, Ghebremichael M, Davis I, et al. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J Virol*. 2012; 86(1):277–283. <https://doi.org/10.1128/JVI.05577-11> PMID: 22031937

57. Buggert M, Norström MM, Czarniecki C, Tupin E, Luo M, Gyllensten K, et al. Characterization of HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses against peptides selected with broad population and pathogen coverage. *PLoS One*. 2012; 7(7):e39874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039874> PMID: 22792193
58. Schieffer M, Jessen HK, Oster AF, Pissani F, Soghoian DZ, Lu R, et al. Induction of Gag-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses during acute HIV infection is associated with improved viral control. *J Virol*. 2014; 88(13):7357–7366. <https://doi.org/10.1128/JVI.00728-14> PMID: 24741089
59. Pancré V, Delhem N, Yazdanpanah Y, Delanoye A, Delacré M, Depil S, et al. Presence of HIV-1 Nef specific CD4<sup>+</sup> T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine*. 2007; 25(31):5927–5937. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.038> PMID: 17600593
60. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, Single RM, Tsai Y, Sanchez-Mazas A, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol*. 2008; 69(7):443–464. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.05.001> PMID: 18638659
61. Castelli FA, Szely N, Olivain A, Casartelli N, Grygar C, Schneider A, et al. Hierarchy of CD4<sup>+</sup> T cell epitopes of the ANRS Lipo5 synthetic vaccine relies on the frequencies of pre-existing peptide-specific T cells in healthy donors. *J Immunol*. 2013; 190(11):5757–5763. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300145> PMID: 23636059
62. Ranasinghe S, Cutler S, Davis I, Lu R, Soghoian DZ, Qi Y, et al. Association of HLA-DRB1-restricted CD4<sup>+</sup> T cell responses with HIV immune control. *Nat Med*. 2013; 19(7):930–933. <https://doi.org/10.1038/nm.3229> PMID: 23793098
63. García F, Climent N, Guardo AC, Gil C, León A, Autran B, et al. A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication. *Sci Transl Med*. 2013; 5(166):166ra2. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004682> PMID: 23283367
64. Jacobson JM, Routy JP, Welles S, DeBenedette M, Tcherepanova I, Angel JB, et al. Dendritic Cell Immunotherapy for HIV-1 Infection Using Autologous HIV-1 RNA: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 72(1):31–38. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000926> PMID: 26751016
65. Yin W, Gorvel L, Zurawski S, Li D, Ni L, Duluc D, et al. Functional Speciality of CD40 and Dendritic Cell Surface Lectins for Exogenous Antigen Presentation to CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T Cells. *EBioMedicine*. 2016; 5:46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.029> PMID: 27077111
66. Flamar AL, Xue Y, Zurawski SM, Montes M, King B, Sloan L, et al. Targeting concatenated HIV antigens to human CD40 expands a broad repertoire of multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *AIDS*. 2013; 27(13):2041–2051. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283624305> PMID: 23615121
67. Flamar AL, Bonnabau H, Zurawski S, Lacabaratz C, Montes M, Richert L, et al. HIV-1 T cell epitopes targeted to Rhesus macaque CD40 and DCIR: A comparative study of prototype dendritic cell targeting therapeutic vaccine candidates. *PLoS One*. 2018; 13(11):e0207794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207794> PMID: 30500852
68. Cheng L, Wang Q, Li G, Banga R, Ma J, Yu H, et al. TLR3 agonist and CD40-targeting vaccination induces immune responses and reduces HIV-1 reservoirs. *J Clin Invest*. 2018; 128(10):4387–4396. <https://doi.org/10.1172/JCI99005> PMID: 30148455
69. Pantaleo G, Levy Y. Therapeutic vaccines and immunological intervention in HIV infection: a paradigm change. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016; 11(6):576–584. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000324> PMID: 27607591

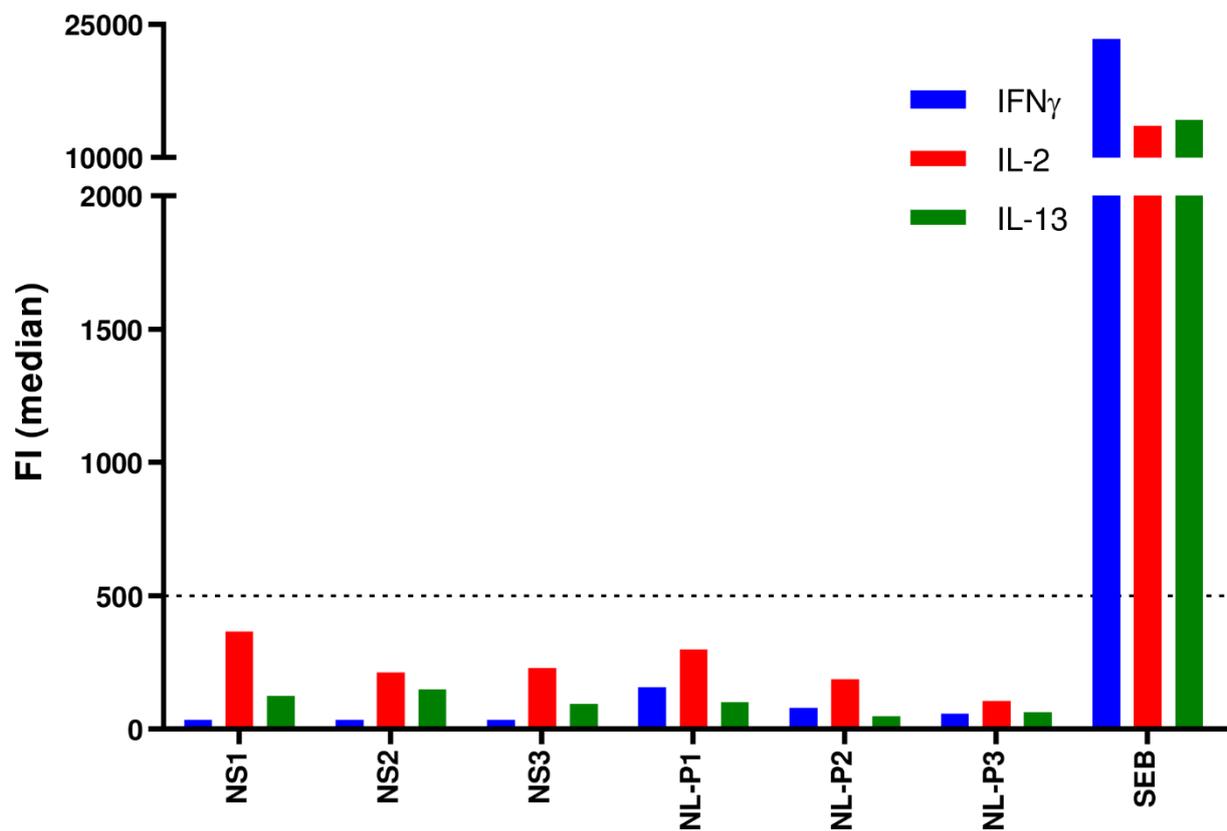
## Supporting information



**S1 Fig. Design of the DALIA trial.** HIV-infected patients have been vaccinated at 0, 4, 8, 12 weeks and antiretroviral treatments have been interrupted at 24 weeks. Apheresis has been performed at 2 to 4 weeks (-2/-4) before the first vaccine injection (week 0), and 16 weeks and 48 weeks thereafter. Blood draw has been performed at each single visit. Of 20 eligible HIV-infected patients, 19 completed the vaccination and 16 reached the 48 weeks visit without resuming their antiretroviral treatment after interrupting it at 24 weeks.

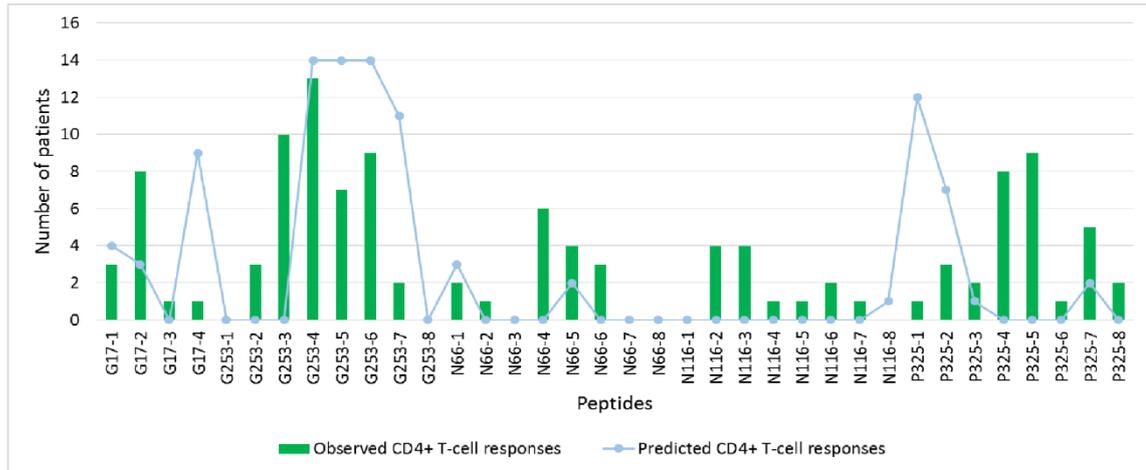


**S2 Fig. Magnitude of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses at W-4.** Magnitude (FI) of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses (median) quantified by Luminex assay after a 48h stimulation of PBMC with individual peptides. Dotted line represents the strong responses threshold defined in Figure 2A.

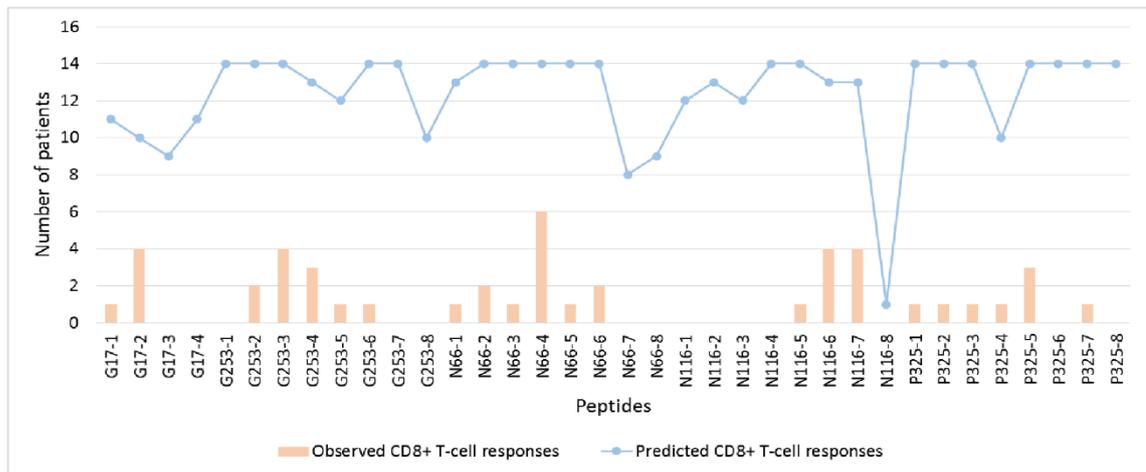


**S3 Fig. Magnitude of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses for controls at W16.** Magnitude (FI) of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 responses (median) quantified by Luminex assay after a 48h stimulation of PBMC with medium alone (3 wells of non-stimulated cells), 3 non-LIPO-5 peptide pools from Gag p2p6 protein, or SEB. Dotted line represents the strong responses threshold defined in Figure 2A.

**A**



**B**



**S4 Fig. Predicted versus Observed T-cell responses.** (A) CD4<sup>+</sup> T-cell responses according to NetMHCIIpan 3.2 HLA-DRB1-binding predicted 15-mer peptides (blue line) or observed after 7-day ICS (green bars) for the 14 patients tested at W16. (B) CD8<sup>+</sup> T-cell responses according to NetMHCpan 4.0 HLA-A/B/C-binding predicted 15-mer peptides (blue line) or observed after 7-day ICS (orange bars) for the 14 patients tested at W16.

REGION	NAME	SEQUENCE
<b>Gag17-35</b>	Gag17-1	LDRWEKIRLRPGGKK
	Gag17-2	EKIRLRPGGKKKYKL
	Gag17-3	LRPGGKKKYKLBHIV
	Gag17-4	GKKKYKLBHIVWASR
<b>Gag253-284</b>	Gag253-1	WMTNNPPIPVGEIYK
	Gag253-2	NPPIPVGEIYKRWII
	Gag253-3	PVGEIYKRWII LGLN
	Gag253-4	IYKRWII LGLNKIVR
	Gag253-5	WII LGLNKIVRMYSP
	Gag253-6	GLNKIVRMYSPSIL
	Gag253-7	IVRMYSPSILDIRQ
	Gag253-8	YSPTSILDIRQGPKE
<b>Nef66-97</b>	Nef66-1	GLTTMVGFPVTPQVP
	Nef66-2	MVGFPVTPQVPLRPM
	Nef66-3	PVTPQVPLRPMTYKA
	Nef66-4	PQVPLRPMTYKAAVDL
	Nef66-5	RPMTYKAAVDLSHFL
	Nef66-6	YKAAVDLSHFLKEKG
	Nef66-7	VDLSHFLKEKGGLEG
	Nef66-8	HFLKEKGGLEGLIHS
<b>Nef116-145</b>	Nef116-1	ILDLWIYHTQGYFPD
	Nef116-2	WIYHTQGYFPDWQNY
	Nef116-3	TQGYFPDWQNYTPGP
	Nef116-4	FPDWQNYTPGPGVRY
	Nef116-5	WQNYTPGPGVRYPLTF
	Nef116-6	PGPGVRYPLTFGWY
	Nef116-7	VRYPLTFGWYKLV
	Nef116-8	LTFGWYKLVPMIET
<b>Pol325-355</b>	Pol325-1	NCKLMAIFQSSMTKI
	Pol325-2	MAIFQSSMTKILEPF
	Pol325-3	FQSSMTKILEPFRKQN
	Pol325-4	TKILEPFRKQNPDI
	Pol325-5	EPFRKQNPDIYIYQY
	Pol325-6	KQNPDIYIYQYMDL
	Pol325-7	DIVIYQYMDLLVGS
	Pol325-8	YQYMDLLVGSLEI

**S1 Table. Peptide sequences.**

Résultats – Deuxième partie : Epitope mapping de l'essai ANRS DALIA

Patients	IFN $\gamma$ (pg/ml)															
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D14	D15	D17	D18	D19
Peptides																
G17-1	2.3	16.9	62.7	2058.1	17.4	348.3	9.7	5.4	1374.5	11.4	4040.0	12.6	21.2	0.6	0.1	95.2
G17-2	7.6	15.0	121.7	51214.1	29.1	48.7		79.0	5373.2	17.8	32552.0	295.3	593.9	18.5	14.1	1215.2
G17-3		17.1	260.0	74.7	6.0	45.4	2.6		12.9	6.3	55.7	6.3	50.4	0.3	6.3	0.0
G17-4		27.2	1109.7	113.0	9.3	27.1	6.6		11.6	1.1	60.7	1.4	10.0	0.3	0.5	
G253-1	7.3	17.9	69.6	22.2	10.6	50.8	5.6		6.5	2.0	56.4	0.5	27.5	0.3	0.1	0.4
G253-2	0.8	49.8	71.0	110.8	26.9	50.0	12.3		386.1	3.9	56.1	57.1	56.7		2.2	311.4
G253-3	11.2	22.8	2872.9	189.7	956.8	68.0	517.0	52.1	6518.3	10.7	405.3	130.9	390.9	150.6	1.2	711.5
G253-4	29.2	35.0	1384.7	6636.6	349.9	28.7	662.0	77.0	5701.6	20.6	9901.8	266.2	372.9	59.7	24.2	596.3
G253-5		13.8	214.3	3476.4	12.9	556.8	528.7	6.2	3164.7	7.2	3741.6	276.7	11.6	2272.3	4.3	0.3
G253-6	0.8	62.4	71.1	1888.5	1135.4	11737.0	2198.8	166.8	4474.1	11.4	11115.1	284.7	22.2	1880.0	72.3	0.9
G253-7	8.8	18.0	50.1	165.4	16.0	767.4	17.1	1.7	8.3	6.6	832.0	9.0	8.4	0.1	0.1	1.1
G253-8	7.3	26.2	52.9	58.2	11.7	41.6	3.5		48.4	3.3	101.9	0.7	5.2	0.1		0.9
N66-1		27.8	23.1	38.8	31.5	85.8	1882.2	9.6	7.5	3.7	205.6	6.6	11.6	3.0	0.5	0.2
N66-2		17.7	81.1	45.0	20.0	228.2	1081.6	2.4	2.8	45.8	86.3	7.7	11.6	0.3	2.2	1.6
N66-3		25.8	24.4	21.8	3.3	20.5			4.6	55.2	243.5	3.3	14.4	1.5	0.1	1.0
N66-4		24.6	53.2	126.7	207.6	33.8	28.7	1.3	29.7	39.1	349.5	1.9	28.1	51.8	0.1	3.7
N66-5		10.3	78.6	67.5	5.8	6.5	392.4	6.7	620.5	2.3	90.3	3.7	14.9	40.2		38.3
N66-6		13.4	140.0	23.1	5.5	13.6	64.4	0.9	4.9	2.6	133.0	6.9	65.3	58.6	0.1	88.9
N66-7		15.6	56.0	47.1	7.6	11.2			23.6	2.3	15.1	7.9	5.3			1.0
N66-8	19.3	16.7	44.5	26.3	6.0	20.3	1.7		4.9	0.7	15.9	9.4	11.2	0.3		0.8
N116-1	5.2	14.2	55.0	13.5	3.5	148.7	53.5		7.3	4.1	123.1	0.5	1.7	9.6	0.5	0.7
N116-2		14.8	27.0	8.9	4.6	9.0	0.9	29.6	1.1	7.2	34.0	0.5	2.5	2958.5	64.8	5.0
N116-3		15.8	28.0	24.3	4.2	19.9		40.2	10.1	8.3	48.6	38.6	15.1	3280.8	222.1	376.8
N116-4		16.5	74.6	12.1	6.0	138.7	6.9	1.3	48.1	2.0	93.3	9.6	6.2	7.2	0.1	531.8
N116-5		24.8	23.5	41.5	4.6	106.1	25.5	76.6	3.0	6.4	342.1	7.0	12.9	0.5	0.5	166.0
N116-6		20.9	17.8	50.5	3.3	6.7	123.4		501.2	94.5	106.7	0.4	98.7		0.1	0.5
N116-7		11.9	50.1	70.8	1.9	8.6	112.3		284.3	52.5	24.1	0.2	76.5	0.1		
N116-8		10.0	20.9	30.2	4.0	12.7	20.6		2.4	1.9	43.2	1.5	27.9	0.1	0.5	4.8
P325-1	34.8	11.0	81.8	16.6	4.0	702.4	4.1		9.3	4.5	64.7	0.7	11.4	0.5	0.1	14.7
P325-2	27.5	19.9	41.0	485.8	8.1	934.2		7.9	7.0	5.4	2078.0	5.0	17.7	0.1	0.1	22.7
P325-3		14.6	19.1	4857.1	1.9	161.8	7.8	2.1	2.5	2.8	8075.5	0.2	168.4	0.5		0.0
P325-4	23.3	18.8	902.2	895.9	290.5	513.6	2377.0	7.7	4.1	1.6	765.4	0.5	65.5	426.8	0.1	
P325-5	66.0	11.2	2889.5	394.7	1232.7	1734.1	6926.6	101.1	1.4	9.8	160.5	1.0	23.7	1036.2	16.3	28.4
P325-6		14.2	37.8	326.3	46.2	30.8	21.6	15.1	4.1	3.6	63.5	1.0	7.5	5.2	11.5	1.4
P325-7	2.7	20.2	132.0	1457.2	101.8	38.7	15.9	19.3	10.5	5.5	41.8	0.4	7.7	1047.2	26.2	56.9
P325-8	14.9	13.8	33.7	9.2	8.2	16.6	2.7		2.6	4.9	48.4	1.9	0.9	242.1	0.5	6.1

Résultats – Deuxième partie : Epitope mapping de l'essai ANRS DALIA

	IL-2 (pg/ml)															
Patients	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D14	D15	D17	D18	D19
Peptides																
G17-1	2.6	2.2	14.9	155.3	12.1	43.9	50.2	18.9	38.2	5.8	72.9	11.4	5.5	8.4	7.3	523.2
G17-2	7.8	0.5	8.4	937.1	17.6	18.2	25.5	124.3	291.6	24.3	1383.9	188.5	64.8	9.9	89.1	2781.3
G17-3	1.5		32.4	58.9	3.1	39.9	22.1		6.9	2.1	4.8	15.8	6.9	4.7	24.2	21.0
G17-4	0.4		40.8	58.6	2.1	41.1	53.3		3.0	2.2	4.8	6.8	7.2	6.6	7.6	20.5
G253-1	5.7	0.5	5.5	15.9	0.7	40.3	38.6	2.5	3.3	2.9	7.1	1.1	5.9	3.2	16.2	14.6
G253-2	1.4	1.6	8.7	30.5	4.5	35.2	103.7		15.5	1.5	12.4	70.2	12.1	2.6	7.2	271.8
G253-3	21.7	2.8	216.8	66.9	161.8	53.7	726.8	48.3	451.6	9.6	111.6	159.8	47.0	330.8	12.5	900.8
G253-4	42.8	5.5	129.6	323.2	54.7	22.5	1118.9	73.7	258.9	20.4	651.9	173.2	41.7	576.2	150.3	1057.7
G253-5	1.3		36.9	500.0	4.3	39.4	300.9	17.3	126.1	12.8	327.7	156.3	7.5	668.5	27.6	27.7
G253-6	1.8	16.6	9.8	526.6	151.4	128.0	368.4	119.1	230.2	10.9	1020.3	173.4	8.4	1074.4	122.6	39.4
G253-7	10.0		3.9	61.3	4.2	44.9	31.8	6.7	8.7	6.4	10.5	11.2	6.1	9.7	18.3	21.5
G253-8	13.7		4.3	26.4	9.8	22.4	31.1	3.4	6.0	0.7	5.8	4.1	3.4	7.2	13.8	9.9
N66-1	0.8	0.5	1.2	15.8	12.7	56.3	430.6	3.5	4.7	1.2	1.3	9.4	5.3	59.0	10.4	19.6
N66-2	1.4		12.8	19.2	3.0	36.7	270.6	3.4	4.0	3.7	5.8	2.9	0.9	20.1	10.4	17.1
N66-3	2.0	9.9	9.8	28.3	0.5	23.0	18.7	2.1	8.5	6.1	28.2	2.0	4.1	8.0	6.3	20.8
N66-4	1.7	6.1	8.3	67.6	28.9	30.2	130.2	9.5	34.1	3.8	83.1	4.6	3.1	93.2	7.1	95.2
N66-5	1.5		10.1	35.1	3.6	10.4	513.7	9.1	37.6	4.5	33.3	3.5	3.1	165.4	17.2	420.3
N66-6	0.3	4.0	24.1	9.3	0.7	23.0	103.2	8.6	11.6	3.8	11.0	3.1	7.4	7.8	5.6	367.8
N66-7	5.0	0.5	10.6	154.7	1.0	16.6	34.3	4.0	11.3	1.6	4.1	3.3	3.6	9.0	6.4	15.6
N66-8	2.3		6.8	51.8	1.4	20.1	27.1	3.8	10.1		10.9	8.0	8.2	3.4	5.4	9.5
N116-1	1.1		1.3	19.3	1.4	19.0	27.0	2.2	3.2	6.1	10.0	1.2	2.6	31.3	17.7	22.5
N116-2	0.9	2.2	3.1	6.5	0.8	20.8	16.7	37.5	5.6	2.4	11.1	1.4	2.9	171.6	117.9	130.0
N116-3	0.8	3.4	3.2	14.1	0.6	17.1	15.2	33.4	6.7	3.3	8.8	9.8	4.2	239.7	195.2	931.7
N116-4	2.1		9.3	23.3	5.0	40.1	24.4	0.5	7.1	1.1	8.4	3.1	2.9	8.6	12.1	674.0
N116-5	1.9	1.6	4.4	30.6	1.2	28.1	24.2	5.7	1.8	1.8	5.5	3.9	2.4	17.5	14.6	349.6
N116-6	0.4	1.5	2.9	16.4	0.7	13.4	31.9	1.0	3.0	4.0	5.8	1.1	4.4	3.9	6.5	15.3
N116-7	0.8	0.9	18.7	29.0	0.5	15.0	54.3	3.3	4.2	2.4	10.5	0.6	6.4	1.4	5.8	29.3
N116-8	1.3		15.3	5.8	0.7	19.8	63.4	0.7	4.5	3.8	10.4	1.0	2.3	4.4	6.6	42.5
P325-1	30.1		9.6	22.1	0.9	99.4	22.1	5.4	9.3	10.9	6.2	2.2	2.4	20.2	6.0	298.2
P325-2	19.2	1.3	1.6	128.1	0.7	35.2	19.0	11.2	6.9	3.0	21.3	3.2	3.1	11.5	8.2	246.3
P325-3	1.5		7.4	1432.6	1.4	56.5	35.0	23.7	5.7	0.7	745.2	1.5	36.8	3.6	4.6	27.8
P325-4	15.2	1.2	117.2	838.0	20.3	109.3	705.0	20.6	14.4	3.3	343.2	2.7	17.2	378.3	12.9	27.4
P325-5	30.7		320.0	663.5	56.2	197.6	1165.2	113.1	3.8	17.6	32.0	0.6	9.9	618.4	72.2	393.5
P325-6	0.6	1.2	8.9	693.1	3.0	24.6	25.6	26.0	7.2	1.9	19.8	1.7	5.1	12.6	37.6	31.6
P325-7	3.0	0.4	18.1	166.2	17.0	30.0	54.6	47.4	14.7	5.7	15.1	3.7	8.9	192.1	87.8	448.6
P325-8	7.9	2.2	2.9	14.1	4.7	17.7	26.6	4.5	4.9	7.2	3.4	2.6	0.7	45.2	18.1	59.1

Patients	IL-13 (pg/ml)															
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D14	D15	D17	D18	D19
Peptides																
G17-1	3.2	0.9	13.1	145.4	10.8	64.9	32.7	10.4	33.0	6.0	189.0	2.7	4.1		0.5	594.9
G17-2	4.8	1.2	5.9	252.0	10.9	23.6	13.7	27.6	64.5	11.6	569.9	29.4	17.4	0.3	7.3	1103.2
G17-3		0.6	52.7	24.8	2.5	39.2	11.1	0.1	9.6	2.1	16.3	3.8	4.0		0.8	5.3
G17-4		1.9	64.6	38.0	2.5	45.4	17.0		5.9		7.5	2.3	5.0	0.0	0.3	0.7
G253-1	3.4		8.9	10.5	0.8	40.4	20.3	1.4	7.3	0.4	8.9	0.6	1.8		0.0	0.7
G253-2	0.3	1.0	15.2	9.0	2.9	68.9	26.3	0.9	28.1	2.1	18.4	20.1	4.4			166.8
G253-3	5.9	0.2	265.7	33.7	52.8	63.8	143.2	15.7	111.2	8.4	255.0	20.0	8.8	15.0		845.2
G253-4	9.3	0.8	288.4	117.9	30.1	27.2	154.9	22.4	68.0	18.4	596.6	17.8	10.3	7.4	21.3	733.6
G253-5			69.1	169.9	1.8	35.5	107.5	4.4	51.1	7.3	415.6	20.6	2.3	50.1	3.3	4.8
G253-6	1.5	4.7	14.4	151.9	62.8	180.1	141.1	17.0	110.6	7.4	765.9	22.6	6.0	65.0	19.2	3.8
G253-7	1.4	0.2	2.8	20.9	2.9	106.1	33.3	4.1	7.9	2.3	45.3	3.7	3.7		1.6	2.7
G253-8	3.1	1.3	4.3	10.5	4.2	38.4	14.8	0.7	3.5	0.9	11.2	1.3	2.1		0.9	0.9
N66-1	1.5	0.8	4.3	7.9	7.2	82.3	350.1	3.0	4.6	2.6	7.2	1.7	2.9	1.6	0.2	1.8
N66-2	0.8	0.8	20.8	7.6	2.9	81.1	173.0	1.9	6.0	4.1	3.9	0.5	1.4	0.0	0.4	3.5
N66-3		1.7	2.7	4.0	0.9	15.8	7.6	0.6	9.1	6.8	86.1	1.0	1.7		0.0	1.1
N66-4		1.4	6.2	30.7	25.7	20.9	62.3	0.9	29.5	7.7	169.9	0.8	1.5	5.8		43.9
N66-5		0.2	8.0	9.3	1.4	3.9	220.4	2.3	31.5	2.0	51.5	0.3	2.4	9.4	0.3	392.2
N66-6		1.5	25.2	2.4		10.6	81.2	3.2	5.7	2.8	29.6	0.6	1.8	0.5	0.2	469.1
N66-7	1.6		4.9	22.2		10.4	17.0	1.2	3.7		9.5	0.9	2.6			2.2
N66-8			10.6	8.1	0.3	14.3	8.0	0.5	9.2		13.0	0.9	3.0			2.3
N116-1		0.2	3.1	6.0	1.0	47.5	46.9	2.9	5.5	3.5	38.9	0.5	0.4	1.4	1.1	0.5
N116-2		1.2	2.6	2.5	0.8	14.9	5.9	17.6	3.6	1.5	15.1	0.1	2.0	124.5	18.2	118.5
N116-3	1.7	0.2	1.8	4.5	0.7	12.9	5.0	25.5	6.6	3.6	10.8	2.4	2.0	82.9	35.4	1076.5
N116-4	2.4	0.8	11.0	9.3	0.4	81.2	17.1	1.6	11.5	1.8	6.4	1.0	2.4	0.5	0.8	1840.6
N116-5	2.9	1.6	5.5	6.9	0.7	59.0	37.2	2.2	4.9	3.7	13.5	1.0	2.6	0.3	1.0	892.8
N116-6		1.3	2.5	2.8		11.4	39.6		5.0	4.6	13.0	0.2	0.7		0.1	0.6
N116-7		0.2	24.4	3.2	1.0	9.4	52.8		4.5	3.2	6.8		0.8		0.0	17.5
N116-8			15.2	2.2	0.6	18.8	49.2	0.4	4.0	2.7	8.4	0.1	0.6		0.0	5.1
P325-1	7.5		9.5	8.8	0.9	106.6	10.9	0.6	4.4	1.3	7.5	1.0	0.9	0.1		244.0
P325-2	7.8	1.2	5.2	85.0	1.9	115.8	9.0	2.4	8.1	5.2	80.4	0.5	1.4			168.1
P325-3	1.5		6.9	159.9		35.0	12.3	2.5	3.8	1.0	319.4	0.3	10.2			6.3
P325-4	5.0	0.2	249.2	90.4	14.4	75.3	445.9	5.8	3.5		189.8	0.6	6.7	12.3	0.5	36.5
P325-5	7.3	0.6	499.6	82.7	17.3	125.0	505.1	26.4	2.9	10.3	64.0	0.3	4.9	19.5	6.4	441.3
P325-6		1.2	10.9	68.9	1.0	20.6	41.1	11.5	3.8	1.0	24.7	0.2	3.5	0.2	8.2	40.5
P325-7	2.6		17.5	73.2	11.3	24.0	20.6	12.8	10.9	4.5	15.0	0.4	2.6	15.9	8.7	245.0
P325-8	6.3	0.6	5.4	4.1	1.5	14.6	8.6	0.3	6.0	2.0	4.6	0.3		15.7	0.3	45.0

**S2 Table. Individual data of IFN $\gamma$ , IL-2 and IL-13 concentration level (pg/ml) at W16.** Luminex assay was performed after a 48h stimulation of PBMC with 36 individual 15-mer peptides. Absence of data means < LLOQ (lower limit of quantification). Positive responses identified using our positivity cut off based on FI are highlighted in yellow.

Patient	Stimulation at day 7	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (%)	Predicted by NETMHCIIpan 3.2	Patient	Stimulation at day 7	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (%)	Predicted by NETMHCIIpan 3.2
D5	NS	0.05	-	D15	NS	0.01	-
D5	<b>G253-3</b>	<b>14.01</b>	-	D15	<b>G17-2</b>	<b>0.51</b>	-
D5	DR0402 NP	0.05	-	D15	DR0301 NP	0.02	-
<b>D5</b>	<b>DR0402 P</b>	<b>3.71</b>	<b>no</b>	<b>D15</b>	<b>DR0301 P</b>	<b>0.27</b>	<b>no</b>
D5	DR0403 NP	0.07	-	D15	DR1301 NP	0.01	-
D5	DR0403 P	0.09	no	D15	<b>DR1301 P</b>	<b>0.25</b>	yes
D5	DAP3 P	0.02	-	D15	DAP3 P	0.02	-
D7	NS	0.38	-	D15	NS	0.01	-
D7	<b>N66-1</b>	<b>16.90</b>	-	D15	<b>G253-3</b>	<b>0.88</b>	-
D7	DR0401 NP	0.19	-	D15	DR0301 NP	0.01	-
<b>D7</b>	<b>DR0401 P</b>	<b>0.97</b>	<b>no</b>	D15	DR0301 P	0.03	no
D7	DR1101 NP	0.27	-	D15	DR1301 NP	0.01	-
D7	DR1101 P	0.30	no	<b>D15</b>	<b>DR1301 P</b>	<b>0.94</b>	<b>no</b>
D7	DAP3 P	0.14	-	D15	DAP3 P	0.01	-
D7	NS	0.11	-	D17	NS	0.02	-
D7	<b>N66-6</b>	<b>4.70</b>	-	D17	<b>N66-5</b>	<b>1.34</b>	-
D7	DR0401 NP	0.11	-	D17	DR0405 NP	0.23	-
<b>D7</b>	<b>DR0401 P</b>	<b>0.79</b>	<b>no</b>	D17	<b>DR0405 P</b>	<b>4.30</b>	yes
D7	DR1101 NP	0.18	-	D17	DR1401 NP	0.16	-
D7	DR1101 P	0.19	no	<b>D17</b>	<b>DR1401 P</b>	<b>4.58</b>	<b>no</b>
D7	DAP3 P	0.15	-	D17	DAP3 P	0.02	-
D8	NS	0.03	-	D17	NS	0.02	-
D8	<b>P325-5</b>	<b>9.89</b>	-	D17	<b>P325-8</b>	<b>4.38</b>	-
D8	DR0101 NP	0.16	-	D17	DR0405 NP	0.19	-
<b>D8</b>	<b>DR0101 P</b>	<b>2.37</b>	<b>no</b>	<b>D17</b>	<b>DR0405 P</b>	<b>5.88</b>	<b>no</b>
D8	DR1501 NP	0.04	-	D17	DR1401 NP	0.08	-
D8	DR1501 P	0.04	no	D17	DR1401 P	0.09	no
D8	DAP3 P	0.02	-	D17	DAP3 P	0.03	-
D14	NS	0.01	-	D18	NS	0.03	-
D14	<b>G253-2</b>	<b>2.90</b>	-	D18	<b>G17-2</b>	<b>14.92</b>	-
D14	DR1104 NP	0.02	-	D18	DR0101 NP	0.09	-
D14	DR1104 P	0.01	no	D18	DR0101 P	0.10	no
D14	DR1301 NP	0.04	-	D18	DR0301 NP	0.05	-
<b>D14</b>	<b>DR1301 P</b>	<b>2.76</b>	<b>no</b>	<b>D18</b>	<b>DR0301 P</b>	<b>3.86</b>	<b>no</b>
D14	DAP3 P	0.01	-	D18	DAP3 P	0.03	-
D14	NS	0.01	-	D18	NS	0.03	-
D14	<b>G253-3</b>	<b>0.40</b>	-	D18	<b>P325-5</b>	<b>18.23</b>	-
D14	DR1104 NP	0.03	-	D18	DR0101 NP	0.12	-
D14	DR1104 P	0.03	no	<b>D18</b>	<b>DR0101 P</b>	<b>0.69</b>	<b>no</b>
D14	DR1301 NP	0.00	-	D18	DR0301 NP	0.09	-
<b>D14</b>	<b>DR1301 P</b>	<b>0.47</b>	<b>no</b>	D18	DR0301 P	0.07	no
D14	DAP3 P	0.02	-	D18	DAP3 P	0.02	-

**S3 Table. Identification of the HLA-DR molecules involved in the CD4<sup>+</sup> T-cell responses using HLA-DRB1-transfected cell lines.** PBMC were stimulated at day 0 with individual 15-mer peptides and cultured during 7 days with rIL-2. ICS assay was performed at day 7 after a 6h restimulation with 15-mer peptides or with HLA-DRB1-transfected cell lines previously pulsed (P) 1 hour with the 15-mer peptides. Non-restimulated PBMC, untransfected DAP.3 cell line pulsed 1 hour with the 15-mer peptides, and HLA-DRB1-transfected cell lines not pulsed (NP) with the 15-mer peptides were used as negative controls. An ICS response was considered positive (highlighted in bold in the table) if the frequency of stimulated CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> cells were > 3-fold the unstimulated cells and > 0.05%. Positive responses not predicted by NetMHCIIpan 3.2 are highlighted in yellow.

Patient	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-Cw	HLA-Cw	HLA-DRB1	HLA-DRB1
D1	2403	6801	1801	4403	0304	1601	0301	0701
D2	0101	2402	0801	5101	0701	1502	0301	1201
D3	0101	0301	1302	5201	0701	0702	0701	0803
D4	3001	6802	5301	*	0401	*	1503	*
D5	2402	2601	3508	3801	0401	1203	0402	0403
D6	0101	3101	4001	5701	0304	0602	0404	0701
D7	0101	0201	3501	4001	0304	0401	0401	1101
D8	0301	6801	0702	3901	0702	*	0101	1501
D9	2301	6802	4501	5802	0602	*	0301	0804
D10	0101	0301	0702	3501	0401	0702	0101	1302
D11	0103	0301	1801	5702	0401	1801g	1104	1503
D14	0101	0201	3502	3801	0401	1203	1104	1301
D15	1101	*	1801	3906	0701g	0702	0301	1301
D17	0301	*	1402	5101	0802	1502	0405	1401
D18	0101	*	0801	*	0701g	*	0101	0301
D19	1101	3201	0801	5201	0701g	1202	0301	1502

**S4 Table. HLA characteristics of participants.**

**Conclusions générales de la deuxième partie :**

Dans cet article, nous avons identifié et caractérisé les réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> observées après vaccination dans l'essai ANRS DALIA. Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé des peptides 15-mers individuels afin d'effectuer des stimulations de PBMC isolées avant et après vaccination, et de doser les cytokines sécrétées par la technique Luminex. Nous avons ainsi pu montrer que les réponses IFN $\gamma$  mais surtout IL-2 et IL-13 étaient inversement corrélées à la charge virale plasmatique maximale observée lors de l'ATI. Parmi les 36 peptides 15-mers testés en Luminex, nous avons pu en identifier 17, situés dans les régions vaccinales conservées de Gag, Pol et Nef, immunodominants ou non, dont la réponse était associée avec un faible rebond viral. Nous avons ensuite utilisé la technique ICS après amplification afin de déterminer quelles étaient les populations cellulaires responsables des réponses observées. Nous avons montré que des LT CD4<sup>+</sup> non cytotoxiques sécrétaient de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL-13 ; et que des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques produisant des granzymes A et B, de la perforine, et exprimant le marqueur de dégranulation CD107a à leur surface étaient responsables de la sécrétion d'IFN $\gamma$ . L'utilisation de 14 lignées différentes transfectées par une molécule HLA-DR unique, obtenues grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr Sette aux USA, nous a aussi permis d'identifier 8 nouveaux épitopes T CD4<sup>+</sup> restreints par des molécules HLA-DRB1. Enfin, à l'aide de peptides 8-10-mers nous avons également identifié les épitopes T CD8<sup>+</sup> optimaux chez ces patients séropositifs pour le VIH-1 vaccinés par LIPO-5 chargé sur des cellules dendritiques.

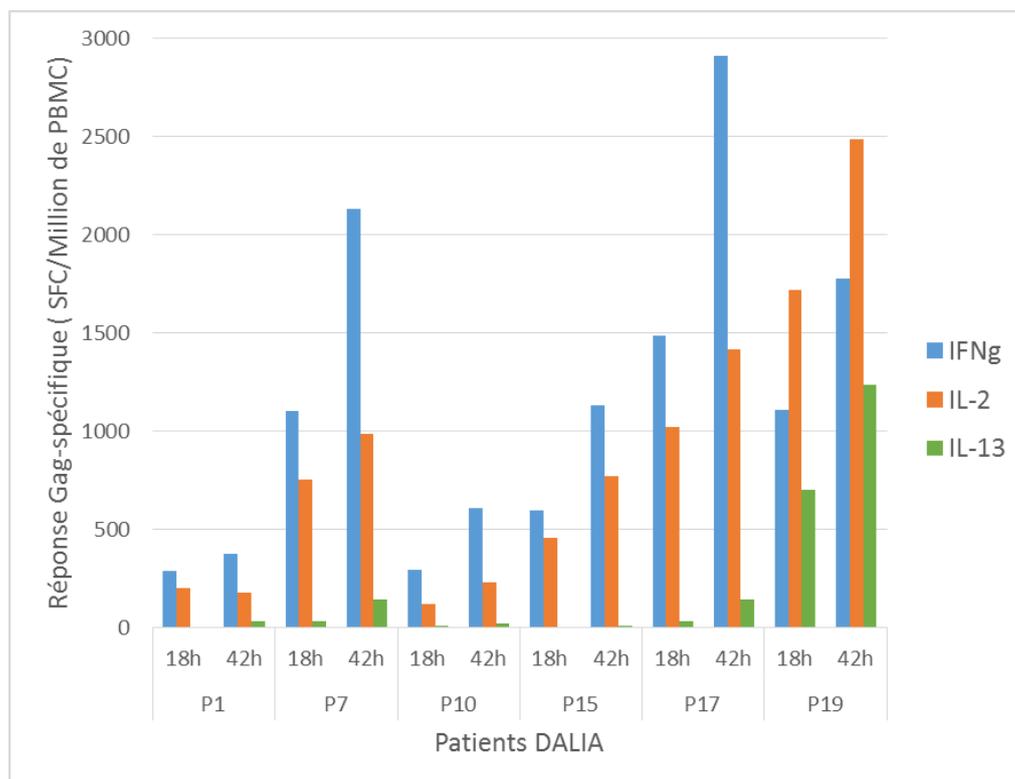
### **III. Troisième partie : L'induction des réponses IL-13 est spécifique de la vaccination lipopeptidique**

Etant donné les corrélations inverses observées entre l'étendue et l'intensité de la réponse IL-13 après vaccination et la valeur maximale de charge virale pendant la phase d'ATI dans l'essai ANRS DALIA, nous avons décidé d'étudier les réponses IL-13 dans d'autres protocoles vaccinaux anti-VIH-1 utilisant notamment des lipopeptides. En effet d'autres publications ont montré un effet de cette cytokine sur la réplication du VIH-1 (Bailer et al., 1999; Montaner et al., 1993), et des réponses de type Th2 ont été associées à une efficacité vaccinale anti-VIH (Sauce et al., 2016) ou anti-VIS (Vaccari et al., 2018). Afin de quantifier ces réponses, nous avons décidé d'utiliser le test ELISpot IL-13. En effet, la technique ELISpot a l'avantage d'être facilement standardisable entre différents laboratoires, elle est plus sensible que la cytométrie de flux et nécessite moins de cellules. Le but de cette troisième partie était donc d'évaluer si la quantification des cellules sécrétrices d'IL-13 par technique ELISpot permettait d'identifier un corrélât de contrôle de la réplication du VIH-1, et ainsi suggérer un éventuel remplacement du test ELISpot IFN $\gamma$  qui jusque-là n'a toujours pas permis de montrer de corrélât de protection. Pour cela, nous avons tout d'abord effectué une phase de mise au point de ce test ELISpot IL-13 puis nous avons comparé les réponses IL-13 observées dans différents essais de vaccination prophylactique et thérapeutique anti-VIH-1 afin de déterminer si la quantité de LT spécifiques du VIH-1 sécrétant de l'IL-13 était dépendante du type de vaccination, du schéma vaccinal ou encore de la dose de vaccin utilisée.

Pour ce troisième objectif, nous avons utilisé des PBMC congelées provenant de volontaires sains ou de patients séropositifs pour le VIH-1 ayant participé à des essais cliniques utilisant des lipopeptides seuls (LIPThera et ANRS VAC 18); associés avec d'autres candidats vaccins comme de l'ADN (ANRS VRI 01 et LIGHT), de l'ALVAC (ANRS 093), du MVA (ANRS VRI 01) ; ou encore des cellules dendritiques chargées avec des lipopeptides (ANRS DALIA) ou avec du VIH-1 autologue (DCV2/MANON07-ORVACS) comme candidat vaccin.

Nous avons décidé de quantifier dans un premier temps les 3 cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2 et IL-13) dont la sécrétion (intensité de la réponse) a été inversement corrélée avec le maximum d'ARN viral détecté en phase ATI dans l'essai DALIA. Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé le temps de stimulation optimal pour la détection de ces différentes cytokines *ex vivo* en utilisant des maxi pools de peptides 15-mers (voir Matériel et Méthodes), sachant que la sécrétion de ces cytokines par les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> avait déjà été observée par technique ICS après amplification. Une étude préliminaire a alors été réalisée sur les PBMC isolées après vaccination (W16) provenant de 6 patients de l'essai ANRS DALIA. J'ai testé 2 temps de stimulation différents : 18h (la durée classique de stimulation pour

le test ELISpot IFN $\gamma$ ) et 42h (afin d'avoir un temps de stimulation comparable à celui du test Luminex) (Figure 51).



**Figure 51 : Réponses ELISpot détectées après 18h ou 42h de stimulation avec le maxipool Gag chez 6 patients de l'essai DALIA**

Nous avons pu observer des réponses IFN $\gamma$ , IL-2 et IL-13 spécifiques de la protéine Gag du VIH-1 après 18h et 42h de stimulation. D'une manière générale, les réponses détectées pour chaque cytokine après 18h de stimulation étaient plus faibles que celles détectées après 42h de stimulation et les réponses IL-13 détectées après 18h de stimulation étaient particulièrement faibles pour 5 des 6 patients testés. Afin de déterminer le meilleur temps d'incubation pour chaque cytokine, nous avons corrélé les réponses ELISpot obtenues avec la charge virale plasmatique maximale de ces patients pendant l'ATI (Tableau 12).

Cytokines	Stimulation Gag 18h		Stimulation Gag 42h	
	r	p	r	p
IFN $\gamma$	-0,6571	0,1750	-0,6000	0,2417
IL-2	<b>-0,8857</b>	<b>0,0333</b>	-0,7714	0,1028
IL-13	-0,7537	0,0778	<b>-0,9276</b>	<b>0,0056</b>

**Tableau 12 : Corrélations (Spearman) entre l'intensité des réponses ELISpot après vaccination et la charge virale maximale pendant l'ATI chez 6 patients de l'essai ANRS DALIA**

Ces premiers résultats ont confirmé ceux obtenus par les tests Luminex, réalisés avec des peptides 15-mers individuels couvrant les séquences de LIPO-5 chez l'ensemble des patients DALIA, pour l'IL-2 et l'IL-13 (le coefficient de corrélation  $r$  est considéré fort (en vert) si  $< -0,5$  et la « p value » est considérée significative (en rouge) si  $< 0,05$ ). Ils nous ont permis de choisir pour la suite des expériences un temps d'incubation de 42h pour les ELISpot IL-13 et de 18h pour les ELISpot IL-2. Etant donné qu'aucune corrélation statistiquement significative n'a été observée pour l'IFN $\gamma$  (peut-être à cause du trop grand nombre de peptides non spécifiques des séquences vaccinales dans le maxipool), nous sommes restés sur l'incubation classique de 18h pour la suite des expériences.

Nous avons ensuite réalisé les tests ELISpot IFN $\gamma$ , IL-2 et IL-13 avec les différents maxipools de peptides 15-mers chez tous les patients de l'essai ANRS DALIA dont les échantillons étaient encore disponibles, en suivant les temps d'incubation préalablement choisis, puis effectué des corrélations de Spearman entre les réponses observées et la charge virale plasmatique maximale pendant l'ATI (**Tableau 13**).

Cytokines	Gag		Nef		Pol/Env		Total HIV		Rev/Tat	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
IFN $\gamma$ (n=14)	-0,4989	0,0721	-0,2571	0,3740	-0,0947	0,7407	-0,4418	0,1158	0,4240	0,1314
IL-2 (n=14)	-0,4989	0,0721	-0,2352	0,4175	-0,3124	0,2711	-0,4637	0,0973	-0,0045	0,9907
IL-13 (n=15)	<b>-0,7601</b>	<b>0,0012</b>	<b>-0,6330</b>	<b>0,0112</b>	<b>-0,6027</b>	<b>0,0183</b>	<b>-0,8122</b>	<b>0,0004</b>	<b>-0,3880</b>	<b>0,1701</b>

**Tableau 13 : Corrélations (Spearman) entre l'intensité des réponses ELISpot après vaccination et la charge virale maximale pendant l'ATI chez tous les patients de l'essai ANRS DALIA**

Après avoir effectué les tests ELISpot sur l'ensemble des échantillons encore disponibles, on constate que seules les corrélations avec l'IL-13 restent significatives (« p-values » et coefficients de corrélation respectivement en rouge et vert dans le **Tableau 13**), et ce avec les différents pools testés contenant les séquences vaccinales (Gag, Nef et Pol/Env) ainsi que la somme de ces pools (HIV total). Le pool contrôle Rev/Tat qui ne comprend aucune séquence vaccinale ne montre aucune corrélation négative avec la charge virale plasmatique maximale pendant l'ATI, comme cela était attendu.

On peut donc conclure que notre test ELISpot IL-13 est robuste (car il permet l'observation de fortes corrélations entre la charge virale maximale pendant l'ATI et les réponses IL-13 détectées par test ELISpot avec des maxipools de peptides 15-mers tout comme cela avait été le cas par test Luminex avec les peptides 15-mers individuels) et permet l'identification d'un corrélat de contrôle de la charge virale dans l'essai DALIA. Par contre, on observe que ce n'est pas le cas pour les tests ELISpot IFN $\gamma$  et IL-2.

Afin de voir si ce corrélat pouvait être généralisé, nous avons ensuite réalisé des tests ELISpot IL-13 dans d'autres essais thérapeutiques. Pour cette étude, je me suis basé sur l'ensemble des résultats obtenus avec les cellules non-stimulées pour fixer le seuil de positivité pour le test ELISpot IL-13. Je l'ai fixé à 3 fois le bruit de fond avec un minimum de 100 SFC/Million de PBMC. Les résultats obtenus dans ces différents essais sont présentés en **Tableau 14** (les fréquences de répondeurs élevées vis-à-vis du maxipool Gag sont identifiées en jaune dans ce tableau).

On observe tout d'abord que parmi les différents essais thérapeutiques analysés, quelques réponses IL-13 sont parfois détectées avant vaccination. Dans l'essai DALIA, des réponses IL-13 sont détectées après vaccination contre toutes les régions vaccinales, avec notamment 40% de répondeurs vis-à-vis du pool Gag. Par contre, dans l'essai DCV-2, aucune réponse IL-13 n'est détectée vis-à-vis des différents pools testés. De même, dans les essais ANRS 093, LIGHT et LIPThera, le protocole vaccinal ne semble pas avoir permis l'induction de réponses IL-13 spécifiques vis-à-vis des séquences contenues dans les vaccins (pourtant, des réponses IFN $\gamma$  ont pu être détectées aux mêmes time-points dans tous ces essais vaccinaux). On peut tirer plusieurs conclusions de ces résultats :

- La sécrétion d'IL-13 n'est pas un corrélat de contrôle de la réplication du VIH-1 généralisable à tous les essais thérapeutiques car aucune réponse IL-13 n'est détectée dans l'essai DCV-2 qui a pourtant permis, tout comme l'essai DALIA, une diminution de la charge virale maximale supérieure ou égale à 1 log<sub>10</sub> pendant la phase d'ATI chez environ la moitié des patients.

- La sécrétion d'IL-13 n'est pas induite de manière spécifique par l'utilisation de vaccins utilisant des cellules dendritiques car aucune réponse IL-13 n'est détectée dans l'essai DCV-2. Cependant, il faut noter que l'immunogénicité était analysée 1 semaine après la deuxième injection vaccinale dans l'essai DCV-2 et 4 semaines après la quatrième injection dans l'essai DALIA.

- Chez les patients séropositifs pour le VIH-1, la sécrétion d'IL-13 n'est induite ni par des lipopeptides injectés seuls, ni par des lipopeptides injectés en association avec un ALVAC, ni par des lipopeptides injectés en « boost » après un « prime » réalisé par un vaccin ADN.

- Par contre, l'IL-13 semble induite spécifiquement par des lipopeptides lorsqu'ils sont chargés sur des cellules dendritiques et injectés par voie sous-cutanée chez les patients séropositifs pour le VIH-1.

Pour clarifier ce dernier point, nous avons donc quantifié l'IL-13 par technique ELISpot dans plusieurs essais prophylactiques anti-VIH-1 utilisant des lipopeptides seuls ou en association avec d'autres candidats vaccins. Les résultats obtenus dans ces différents essais sont présentés en **Tableau 15** (les fréquences de répondeurs élevées vis-à-vis du maxipool Gag sont identifiées en jaune dans ce tableau).

	DALIA		DCV-2/MANON07		ANRS 093		LIGHT		LIPHTERA	
type de vaccin	Thérapeutique (VIH+)		Thérapeutique (VIH+)		Thérapeutique (VIH+)		Thérapeutique (VIH+)		Thérapeutique (VIH+)	
voie d'injection	sc		sc + ID		IM		IM		IM	
vaccin	4 x [DC chargées avec LIPO-5 (Gag/Pol/Nef) et activées par LPS]		3 x [DC loadées avec HIV-1 et activées par cytokines]		4 x [ALVAC recombinant Env/Gag/Pol/Nef + LIPO-6T (Gag/Pol/Nef/TT)]		3 x [DNA Env/Gag/Pol/Nef/Rev/Tat] + 2 x [LIPO-5 (Gag/Pol/Nef)]		3 x [LIPO-6 (Gag/Nef/Env)]	
time-point	W0	W16 (4 semaines après la 4ème injection de DC/LIPO-5)	W0	W3 (1 semaine après la 2ème injection de DC/HIV)	W0	W16 (4 semaines après la 4ème injection de vCP1433/LIPO-6T)	W0	W28 (4 semaines après le 2ème boost de LIPO-5)	W0	W3+14 (2 semaines après la 2ème injection de LIPO-6)
Réponses ELISpot IL-13 pool Gag	1/15 (7%)	6/15 (40%)	ND	0/9 (0%)	ND	0/13 (0%)	1/13 (8%)	1/13 (8%)	0/2 (0%)	0/10 (0%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Nef	0/15 (0%)	4/15 (27%)	ND	0/9 (0%)	ND	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/2 (0%)	0/10 (0%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Pol/Env	1/15 (7%)	5/15 (33%)	ND	0/9 (0%)	ND	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/2 (0%)	0/10 (0%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Rev/Tat	ND	0/14 (0%)	ND	0/9 (0%)	ND	1/13 (8%)	1/13 (8%)	0/13 (0%)	ND	ND

ND = non fait

**Tableau 14 : Résultats des tests ELISpot IL-13 réalisés dans différents essais thérapeutiques anti-VIH-1**

	VAC 18			VRI 01			
type de vaccin	Prophylactique (VIH-)			Prophylactique (VIH-)			
voie d'injection	IM			IM			
vaccin	4 x [LIPO-5 (Gag/Pol/Nef)]			3 x [DNA Env/Gag/Pol/Nef/Rev/Tat] et/ou 2 x [MVA (Gag/Pol/Nef)] et/ou 2 x [LIPO-5 (Gag/Pol/Nef)]			
time-point	W0	W14 (2 semaines après la 3ème injection de LIPO-5)	W0	W10 (2 semaines après le prime LIPO-5)	W10 (2 semaines après le prime MVA)	W14 (2 semaines après le prime DNA)	W30 (2 semaines après le 2ème boost de LIPO-5)
Réponses ELISpot IL-13 pool Gag	0/7 (0%)	9/30 (30%)	0/6 (0%)	4/16 (25%)	0/10 (0%)	1/11 (9%)	1/19 (5%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Nef	0/7 (0%)	3/30 (10%)	1/6 (17%)	0/16 (0%)	1/10 (10%)	0/11 (0%)	0/19 (0%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Pol/Env	0/7 (0%)	2/30 (7%)	0/6 (0%)	0/16 (0%)	0/10 (0%)	1/11 (9%)	1/19 (5%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Rev/Tat	ND	ND	0/6 (0%)	0/16 (0%)	0/10 (0%)	1/11 (9%)	0/19 (0%)

ND = non fait

**Tableau 15 : Résultats des tests ELISpot IL-13 réalisés dans différents essais prophylactiques anti-VIH-1**

On observe tout d'abord qu'un des 13 volontaires sains testés avant vaccination (essais VAC 18 et VRI 01) présente une réponse positive contre le maxipool Nef. Il s'agit certainement d'une réponse non-spécifique liée à une réaction croisée avec un des épitopes présents dans le maxipool. Dans l'essai ANRS VAC 18, des réponses IL-13 sont détectées après vaccination contre les différentes régions vaccinales conservées, avec notamment 30% de répondeurs vis-à-vis du pool Gag. De manière intéressante, on remarque dans l'essai VRI 01 qu'après un « prime » LIPO-5 on détecte 25% de répondeurs vis-à-vis du pool Gag tandis qu'après un « prime » réalisé avec les vaccins MVA ou ADN on ne peut pas conclure à l'induction de réponses IL-13 spécifiques des séquences conservées du VIH-1 incluses dans LIPO-5 (alors que des réponses IFN $\gamma$  étaient bien détectées après un « prime » MVA, **Tableau 10**). De plus, on peut voir qu'un « boost » LIPO-5 réalisé après un « prime » MVA ou ADN ne permet pas l'induction de réponses IL-13. On peut tirer plusieurs conclusions de ces résultats :

- La sécrétion d'IL-13 n'est pas spécifique aux patients séropositifs pour le VIH-1.
- Chez les volontaires sains, la sécrétion d'IL-13 est induite par des lipopeptides injectés par voie IM seuls ou en « prime » mais pas en « boost » après un « prime » réalisé avec un autre candidat vaccin.
- Les réponses IL-13 induites chez les volontaires de l'essai VAC 18 semblent cibler plus de régions différentes de LIPO-5 que celles induites chez les patients ayant reçu le « prime » LIPO-5 dans l'essai VRI 01.

Pour essayer de comprendre cette dernière observation, nous avons regardé si la dose de LIPO-5 injectée pouvait avoir un effet sur la réponse IL-13 observée sachant que l'essai ANRS VAC 18 évaluait 3 doses différentes de vaccin (50 $\mu$ g, 150 $\mu$ g et 500 $\mu$ g de chaque lipopeptide) alors que l'essai VRI 01 utilisait le LIPO-5 à 500 $\mu$ g/lipopeptide. Nos résultats montrent que dans l'essai ANRS VAC 18, la dose intermédiaire de 150 $\mu$ g semble être la plus immunogène concernant l'induction de la réponse IL-13 puisque l'on observe respectivement 10% et 0% de répondeurs vis-à-vis des régions Gag et Nef après une vaccination avec 50 $\mu$ g de chaque lipopeptide ; 30% et 10% après une vaccination avec 500 $\mu$ g de chaque lipopeptide ; et 50% et 20% après une vaccination avec 150 $\mu$ g de chaque lipopeptide (**Tableau 16**, les fréquences de répondeurs élevées vis-à-vis du maxipool Gag sont identifiées en jaune dans ce tableau). Il est intéressant de noter que cette dose intermédiaire de 150 $\mu$ g avait également donné le meilleur pourcentage de répondeurs au test de lymphoprolifération utilisé pour évaluer les réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques du vaccin (55% contre 47% et 44% avec les doses respectives de 150 $\mu$ g, 50 $\mu$ g et 500 $\mu$ g) lors de la publication des résultats principaux de l'essai ANRS VAC 18 ([Salmon-Céron et al., 2010](#)). Ces résultats peuvent donc expliquer les différences entre les réponses IL-13 observées après injection de LIPO-5 dans les essais ANRS VAC 18 et VRI 01.

**Conclusions générales de la troisième partie :**

L'absence de réponse IL-13 dans l'essai DCV-2 nous permet de conclure que la sécrétion d'IL-13 ne représente pas un corrélat de contrôle de la réplication du VIH-1 généralisable à tous les essais vaccinaux thérapeutiques. En effet, même si l'étude des réponses IL-13 a été effectuée une semaine après la deuxième injection vaccinale dans l'essai DCV-2 alors qu'elle a été effectuée quatre semaines après la quatrième injection vaccinale dans l'essai DALIA, on peut estimer que l'utilisation de ces différents time-points n'était pas un problème car des réponses IFN $\gamma$  ont bien été détectées par la technique ELISpot à ces mêmes time-points pour ces deux essais.

Si une sécrétion d'IL-13 peut être observée quelle que soit la population ciblée par la vaccination (patients séropositifs pour le VIH-1 ou volontaires sains), elle semble bien spécifique du type de vaccination utilisée. En effet, alors que des lipopeptides injectés seuls ou en « prime » par voie IM chez des volontaires sains permettent bien la sécrétion d'IL-13, l'injection de ces mêmes lipopeptides en « boost » après un « prime » MVA ou ADN ne permet pas la sécrétion d'IL-13. De plus, l'utilisation de lipopeptides chargés sur des DC semble nécessaire pour induire la sécrétion d'IL-13 chez les patients séropositifs pour le VIH-1. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats est que l'injection de lipopeptides par voie IM ne permet pas la repolarisation d'un environnement de type Th1 (induit par d'autres candidats vaccins injectés en « prime » ou en association avec les lipopeptides ; ou encore présent chez des individus séropositifs pour le VIH-1 à cause de l'activation du système immunitaire et de l'inflammation chronique causée par l'infection) vers un environnement Th2 et donc la sécrétion d'IL-13. Par contre, l'utilisation de DC générées *ex vivo* à partir de monocytes de patients VIH-1, chargées par des lipopeptides puis maturées avant d'être réinjectées chez les patients, pourrait le permettre.

Le **Tableau 17** présente un résumé des réponses IL-13 observées (réponses positives en jaune) ainsi que les caractéristiques des candidats vaccins lipopeptidiques et des essais cliniques analysés dans cette étude.

		VAC 18		
type de vaccin	Prophylactique (VIH-)			
voie d'injection	IM			
vaccin	LIPO-5 (Gag/Pol/Nef) à 50, 150 ou 500µg			
time-point	W0	W14 (2 semaines après la 3ème injection de 50µg de LIPO-5)	W14 (2 semaines après la 3ème injection de 150µg de LIPO-5)	W14 (2 semaines après la 3ème injection de 500µg de LIPO-5)
Réponses ELISpot IL-13 pool Gag	0/7 (0%)	1/10 (10%)	5/10 (50%)	3/10 (30%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Nef	0/7 (0%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	1/10 (10%)
Réponses ELISpot IL-13 pool Pol/Env	0/7 (0%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)

**Tableau 16 : Résultats des tests ELISpot IL-13 réalisés dans l'essai ANRS VAC 18 en fonction de la dose vaccinale injectée**

Essais cliniques	Statut VIH	vaccin à base de cellules dendritiques	Lipo-6T utilisé en association avec un ALVAC	Lipo-5 utilisé seul ou en "prime"	Lipo-5 utilisé en "boost" après un "prime" ADN ou MVA	Réponses T IL-13-spécifiques détectées par ELISpot
ANRS DALIA-1	+	+	-	+	-	+
DCV2/MANON07-ORVACS	+	+	-	-	-	-
ANRS 093	+	-	+	-	-	-
ANRS LIGHT	+	-	-	-	+	-
LIPHTERA	+	-	-	+	-	-
ANRS VAC 18	-	-	-	+	-	+
ANRS VRI 01 bras 2 (étude de l'immunogénicité après le "prime")	-	-	-	+	-	+
ANRS VRI 01 bras 1 et 3 (étude de l'immunogénicité après le "boost")	-	-	-	-	+	-

**Tableau 17 : Bilan des réponses ELISpot IL-13**

#### **IV. Quatrième partie : Comparaison des épitopes T CD8<sup>+</sup> induisant une réponse IFN $\gamma$ anti-VIH-1 dans différents essais vaccinaux utilisant des lipopeptides**

Après avoir identifié les épitopes optimaux ciblés par les LT CD8<sup>+</sup> des patients de l'essai DALIA, nous avons pu également lors d'un quatrième objectif comparer ces épitopes avec ceux identifiés dans les essais ANRS VAC 04, LIPATHERA et ANRS 093. Le but de ce quatrième objectif était ainsi d'évaluer notamment si l'immunodominance des réponses T CD8<sup>+</sup> dirigées contre les régions conservées du VIH-1 incluses dans les lipopeptides pouvait varier entre des patients séropositifs pour le VIH-1 et des volontaires sains vaccinés par des candidats vaccins contenant en partie des lipopeptides similaires. Afin de réaliser cette comparaison des réponses T CD8<sup>+</sup> entre ces essais, j'ai utilisé les résultats de tests ELISpot IFN $\gamma$  (pour les essais VAC 04 et LIPATHERA et ANRS 093) ainsi que des résultats de tests ICS (pour l'essai DALIA).

Les réponses T CD8<sup>+</sup> optimales décrites dans l'essai prophylactique VAC 04 ont été identifiées par test ELISpot IFN $\gamma$  après amplification des cellules spécifiques alors que celles décrites dans les essais thérapeutiques LIPATHERA et ANRS 093 ont été identifiées par test ELISpot IFN $\gamma$  *ex vivo*.

Les réponses T CD8<sup>+</sup> optimales de l'essai thérapeutique ANRS 093 n'ont pas été publiées, cependant j'avais réalisé des tests ELISpot IFN $\gamma$  *ex vivo* avec des peptides 8-10-mers afin d'identifier les épitopes T CD8<sup>+</sup> ciblés par les patients de cet essai. Seules quelques réponses spécifiquement induites par le vaccin (absente avant vaccination) ont pu être identifiées chez 3 patients vaccinés.

Les réponses T CD8<sup>+</sup> optimales décrites dans l'essai DALIA ont quant à elles été identifiées par technique ICS après amplification des cellules spécifiques. Ces réponses ne sont pas toutes présentées dans l'article publié dans PLOS Pathogens. En effet, pour chaque peptide 15-mers induisant une réponse T CD8<sup>+</sup>, seul le peptide optimal 8-10-mers induisant la plus forte réponse T CD8<sup>+</sup> a été décrit dans la publication. Afin de pouvoir comparer au mieux les réponses T CD8<sup>+</sup> induites par la vaccination entre les différents essais, j'ai pris en compte toutes les réponses T CD8<sup>+</sup> observées vis-à-vis des différents peptides 8-10-mers testés, après avoir pris soin d'exclure les épitopes situés dans les peptides 15-mers ayant induit une réponse IFN $\gamma$  avant vaccination.

Les molécules HLA de restriction probables ont été déterminées initialement suite à la description des épitopes dans la littérature ([Gahery-Segard et al., 2003](#); [Gahery et al., 2006](#)). Pour compléter ces informations, j'ai utilisé le logiciel NetMHCpan 4.0 ([Jurtz et al., 2017](#)) lorsque cela était possible (accès au typage HLA des individus) pour regarder si la liaison de ces épitopes aux molécules HLA de classe I des individus vaccinés était prédite. J'ai considéré une molécule HLA de restriction comme probable si elle était décrite dans la littérature et/ou prédite par NetMHCpan 4.0.

Les épitopes T CD8<sup>+</sup> identifiés dans les essais ANRS VAC 04, LIPHTHERA, ANRS 093 et DALIA sont respectivement présentés dans les **Tableaux 18, 19, 20 et 21** et le **Tableau 22** représente le bilan des épitopes T CD8<sup>+</sup> immunodominants et sous-dominants identifiés dans les différents essais en fonction des molécules HLA (plus la fréquence de réponses est importante, plus elle apparait en vert foncé dans ce tableau).

Volontaire	HLA 1	HLA 2	HLA 3	HLA 4	HLA 5	HLA 6	Séquence peptidique	Nom du peptide	HLA décrit	HLA prédit (NetMHCpan 4.0)	HLA probable
V4.03	A2	-	B18	B58	NA	NA	EYKRWIIL	GAG 260-268	A2	-	A2
V4.03	A2	-	B18	B58	NA	NA	ILGLNKIV	GAG 267-274	A2	-	A2
V4.03	A2	-	B18	B58	NA	NA	RMYSPTSIL	GAG 275-283	A2	A0201/B5801	A2/B58
V04.06	A2	A68	B39	B53	NA	NA	FPVTPQVPL	NEF 68-76	B53	B3901/B5301	B39/B53
V04.06	A2	A68	B39	B53	NA	NA	YPLTFGWYCY	NEF 135-143	B53	B5301	B53
V04.06	A2	A68	B39	B53	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B53	-	B53
V4.08	A3	A24	B7	B27	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B7	-	B7
V4.08	A3	A24	B7	B27	NA	NA	MYSPTSIL	GAG 276-283	A24	A2402	A24
V4.08	A3	A24	B7	B27	NA	NA	KRWIILGLNK	GAG 263-272	B27	B2705	B27
V4.12	A3	A11	B8	-	NA	NA	AVDLSHFLK	NEF 84-92	A3/A11	A0301/A1101	A3/A11
V4.14	A1	A2	B15	B57	NA	NA	FPDWQNYT	NEF 121-128	A1	-	A1
V4.14	A1	A2	B15	B57	NA	NA	PLTFGWYCYKL	NEF 136-145	A2	-	A2
V4.14	A1	A2	B15	B57	NA	NA	LTFGWYCYKL	NEF 137-145	A2	-	A2
V4.14	A1	A2	B15	B57	NA	NA	ILGLNKIV	GAG 267-274	A2	-	A2
V4.15	A3	A29	B44	B53	NA	NA	IILGLNKIVR	GAG 266-275	A3	-	A3
V4.15	A3	A29	B44	B53	NA	NA	TPQVPLRPM	NEF 71-79	B53	B5301	B53
V4.15	A3	A29	B44	B53	NA	NA	YPLTFGWYCY	NEF 135-143	B53	A2901/B5301	A29/B53
V4.15	A3	A29	B44	B53	NA	NA	PPIPVGEIY	GAG 254-262	B53	A2901/B5301	A29/B53
V4.15	A3	A29	B44	B53	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B53	-	B53
V4.20	A1	A24	B7	B38	NA	NA	MYSPTSIL	GAG 276-283	A24	A2402	A24
V4.23	A29	A32	B35	B51	NA	NA	FPVTPQVPL	NEF 68-76	B35/B51	B3501/B5101/B5102	B35/B51
V4.23	A29	A32	B35	B51	NA	NA	TPQVPLRPM	NEF 71-79	B35/B51	B3501/B5102	B35/B51
V4.23	A29	A32	B35	B51	NA	NA	TPQVPLRPMY	NEF 71-81	B35/B51	B3501	B35/B51
V4.26	A29	A32	B14	-	NA	NA	VRYPLTFGW	NEF 133-141	A32	A2901/A3201/B1401	A29/A32/B14
V4.30	A2	-	B61 (B40)	B64 (B14)	NA	NA	KAADVLSHFL	NEF 82-91	A2	-	A2
V4.30	A2	-	B61 (B40)	B64 (B14)	NA	NA	AAVDLSHFL	NEF 83-91	A2	-	A2
V4.30	A2	-	B61 (B40)	B64 (B14)	NA	NA	AVDLSHFL	NEF 84-91	A2	-	A2
V4.30	A2	-	B61 (B40)	B64 (B14)	NA	NA	PLTFGWYCYKL	NEF 136-145	A2	-	A2
V4.30	A2	-	B61 (B40)	B64 (B14)	NA	NA	LTFGWYCYKL	NEF 137-145	A2	-	A2
V4.30	A2	-	B61 (B40)	B64 (B14)	NA	NA	EYKRWIIL	GAG 260-268	A2	B1401	A2/B14
V4.04	A24	-	B41	B62 (B15)	NA	NA	IYKRWIILGL	GAG 261-270	A24	A2402	A24
V4.05	A2	A11	B18	B27	NA	NA	KRWIILGLNK	GAG 263-272	B27	B2705	B27
V4.05	A2	A11	B18	B27	NA	NA	LTFGWYCYKL	NEF 137-145	A2	-	A2
V4.05	A2	A11	B18	B27	NA	NA	AVDLSHFLK	NEF 84-92	A11	A1101	A11
V4.13	A2	A24	B51	B53	NA	NA	LTFGWYCYKL	NEF 137-145	A2	-	A2
V4.13	A2	A24	B51	B53	NA	NA	TYKAAVDL	NEF 80-87	A24	-	A24
V4.13	A2	A24	B51	B53	NA	NA	RYPLTFGWYCY	NEF 134-143	A24	A2402	A24
V4.13	A2	A24	B51	B53	NA	NA	MYSPTSIL	GAG 276-283	A24	A2402	A24
V4.13	A2	A24	B51	B53	NA	NA	TPGPGVRY	NEF 128-135	B51/B53	B5301	B51/B53
V4.13	A2	A24	B51	B53	NA	NA	YPLTFGWYCY	NEF 135-143	B51/B53	B5301	B51/B53
V4.21	A1	A32	B8	B51	NA	NA	GEIYKRWII	GAG 259-267	B8	-	B8
V4.25	A2	A32	B35	B44	NA	NA	YPLTFGWYCY	NEF 135-143	B35	B3501	B35
V4.27	A2	A26	B7	B51	NA	NA	LTFGWYCYKL	NEF 137-145	A2	-	A2
V4.27	A2	A26	B7	B51	NA	NA	ILGLNKIV	GAG 267-274	A2	-	A2
V4.27	A2	A26	B7	B51	NA	NA	TPGPGVRYPL	NEF 128-137	B7/B51	B0702/B5102	B7/B51
V4.27	A2	A26	B7	B51	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B7/B51	-	B7/B51
V4.29	A1	A32	B8	-	NA	NA	GEIYKRWII	GAG 259-267	B8	-	B8
V4.32	A26	A68	B35	B51	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B35/B51	-	B35/B51
V4.33	A3	-	B8	B65 (B14)	NA	NA	GEIYKRWII	GAG 259-267	B8	-	B8
V4.34	A3	A26	B39	B60 (B40)	NA	NA	ILGLNKIVR	GAG 267-275	A3	A0301	A3

NA = HLA non disponible

**Tableau 18 : Epitopes T CD8<sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l'essai ANRS VAC 04**

Résultats – Quatrième partie : Comparaison des épitopes T CD8<sup>+</sup>

Volontaire	HLA 1	HLA 2	HLA 3	HLA 4	HLA 5	HLA 6	Séquence peptidique	Nom du peptide	HLA décrit	HLA prédit (NetMHCpan 4.0)	HLA probable
C02	A3/A11	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	WIIILGLNK	GAG 265-272	A3/A11	NA	A3/A11
C02	A3/A11	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	TPQVPLRPMTY	NEF 71-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C08	A2	NA	NA	NA	NA	NA	FLKEKGGL	NEF 90-97	A2	NA	A2
C08	A2	NA	NA	NA	NA	NA	PLTFGWICYL	NEF 136-145	A2	NA	A2
C06	NA	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	TPQVPLRPM	NEF 71-79	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C06	NA	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	TPQVPLRPMTY	NEF 71-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C06	NA	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C06	NA	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	PIIPVGEIY	GAG 254-262	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	VPLRPMTY	NEF 74-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	RPMTYKAAV	NEF 77-85	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	TPGPGVRY	NEF 128-135	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	TPGPGVRYPL	NEF 128-137	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	GPGVRYPLTF	NEF 130-139	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C10	NA	NA	B7/B35/B51/B53	B38	NA	NA	PIIPVGEIY	GAG 254-262	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
C12	A2	NA	NA	NA	NA	NA	FLKEKGGL	NEF 90-97	A2	NA	A2
R01	A2	NA	NA	NA	NA	NA	LTFGWICYL	NEF 137-145	A2	NA	A2
R03	A3/A11	NA	B7/B35/B51/B53	B8	NA	NA	YPLTFGWICY	NEF 135-143	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R03	A3/A11	NA	B7/B35/B51/B53	B8	NA	NA	GEIYKRWII	GAG 259-267	B8	NA	B8
R06	NA	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	TPQVPLRPMTY	NEF 71-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R06	NA	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	VPLRPMTY	NEF 74-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R10	A2	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	ILGLNKIV	GAG 267-274	A2	NA	A2
R10	A2	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	TPQVPLRPMTY	NEF 71-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R10	A2	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	VPLRPMTY	NEF 74-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R11	A2	NA	NA	NA	NA	NA	RMYSPTSIL	GAG 275-283	A2	NA	A2
R13	NA	NA	B8	NA	NA	NA	FLKEKGGL	NEF 90-97	B8	NA	B8
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	RYPLTFGWICY	NEF 134-143	A24	NA	A24
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	IYKRWIILGL	GAG 261-270	A24	NA	A24
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	TPQVPLRPMTY	NEF 71-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	VPLRPMTY	NEF 74-81	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	GPGVRYPLTF	NEF 130-139	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	YPLTFGWICY	NEF 135-143	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	NPIIPVGEIY	GAG 253-262	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53
R14	A24	NA	B7/B35/B51/B53	NA	NA	NA	ILGLNKIVRMY	GAG 267-277	B7/B35/B51/B53	NA	B7/B35/B51/B53

NA = HLA non disponible

**Tableau 19 : Epitopes T CD8<sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l'essai LIPTHERA**

Patient	HLA 1	HLA 2	HLA 3	HLA 4	HLA 5	HLA 6	Séquence peptidique	Nom du peptide	HLA décrit	HLA prédit (NetMHCpan 4.0)	HLA probable
23005	A03	A26	B27	B5601	NA	NA	KIRLRPGGK	GAG 18-26	A3	A0301	A3
23005	A03	A26	B27	B5601	NA	NA	RLRPGGKKK	GAG 20-28	A3	A0301	A3
23005	A03	A26	B27	B5601	NA	NA	KRWIILGLNK	GAG 263-272	B27	B2705	B27
34006	A2416	A2903	B35	-	NA	NA	RYPLTFGWICY	NEF 134-143	A24	A2402/A2903	A24/A29
34006	A2416	A2903	B35	-	NA	NA	YPLTFGWICY	NEF 135-143	B35	A2903/B3501	A29/B35
59006	A02	A3601	B44	B51	NA	NA	GPGVRYPLTF	NEF 130-139	B51	-	B51

NA = HLA non disponible

**Tableau 20 : Epitopes T CD8<sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l'essai ANRS 093**

Patient	HLA 1	HLA 2	HLA 3	HLA 4	HLA 5	HLA 6	Séquence peptidique	Nom du peptide	HLA décrit	HLA prédit (NetMHCpan 4.0)	HLA probable
D4	A3001	A6802	B5301	-	C0401	-	RLRPGGKKK	GAG 20-28	A30	A3001	A30
D5	A2402	A2601	B3508	B3801	C0401	C1203	NPDIVIYQY	POL 342-350	B35	B3508	B35
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	GEIYKRWII	GAG 259-267	?	B4001	B40
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	EIYKRWII	GAG 260-268	A2	A0201	A2
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	YPLTFGWY	NEF 135-143	B35	B3501	B35
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	RYPLTFGWY	NEF 134-143	?	B3501	B35
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	RYPLTFGW	NEF 134-141	?	-	?
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	PLTFGWYK	NEF 136-145	A2	-	A2
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	VGFPVTPQV	NEF 66-74	B35?	C0304	C3
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	FPVTPQVPL	NEF 68-76	B35	B3501	B35
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	GFPVTPQVPL	NEF 67-76	?	B3501	B35
D7	A0101	A0201	B3501	B4001	C0304	C0401	NPDIVIYQY	POL 342-350	B35	B3501	B35
D8	A0301	A6801	B0702	B3901	C0702	-	KIRLRPGGKK	GAG 18-27	A3	A0301	A3
D9	A2301	A6802	B4501	B5802	C0602	-	LRPGGKKKY	GAG 21-29	?	C0602	C6
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	KIRLRPGGKK	GAG 18-27	A3	A0301	A3
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	KIRLRPGGK	GAG 18-26	A3	A0301	A3
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	YPLTFGWY	NEF 135-143	B7/B35	B3501	B7/B35
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	RYPLTFGWY	NEF 134-143	?	B3501	B35
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	PLTFGWYK	NEF 136-144	A3	A0301	A3
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	LTFGWYK	NEF 137-144	?	A0301	A3
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	GFPVTPQVPL	NEF 67-76	?	B0702/B3501	B7/B35
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	FPVTPQVPL	NEF 68-76	B7/B35	B0702/B3501/C0401	B7/B35/C4
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	TPQVPLRPMTY	NEF 71-81	B7/B35	B0702/B3501	B7/B35
D10	A0101	A0301	B0702	B3501	C0401	C0702	TPQVPLRPM	NEF 71-79	B7/B35	B0702/B3501	B7/B35
D15	A1101	-	B1801	B3906	C0701	C0702	AVDLSHFLK	NEF 84-92	A11	A1101	A11
D15	A1101	-	B1801	B3906	C0701	C0702	FQSSMTKIL	POL 327-335	?	B3906/C0701/C0702	B39/C7
D17	A0301	-	B1402	B5101	C0802	C1502	QVPLRPMTYK	NEF 73-82	A3	A0301	A3
D17	A0301	-	B1402	B5101	C0802	C1502	AAVDLSHFL	NEF 83-91	?	C0802/C1502	C8/C15
D17	A0301	-	B1402	B5101	C0802	C1502	KAADVLSHFL	NEF 82-91	B14/B51	C1502	B14/B51/C15
D18	A0101	-	B0801	-	C0701	-	IYKRWII	GAG 261-268	?	B0801	B8
D19	A1101	A3201	B0801	B5201	C0701	C1202	EIYKRWII	GAG 260-267	B8	B0801	B8
D19	A1101	A3201	B0801	B5201	C0701	C1202	GEIYKRWII	GAG 259-267	B8	-	B8
D19	A1101	A3201	B0801	B5201	C0701	C1202	EIYKRWII	GAG 260-268	?	B0801	B8
D19	A1101	A3201	B0801	B5201	C0701	C1202	QVPLRPMTYK	NEF 73-82	A11	A1101	A11
D19	A1101	A3201	B0801	B5201	C0701	C1202	AVDLSHFLK	NEF 84-92	A11	A1101	A11
D19	A1101	A3201	B0801	B5201	C0701	C1202	AIFQSSMTK	POL 325-333	A11	A1101	A11

**Tableau 21 : Épitopes T CD8<sup>+</sup> présents dans LIPO-5 identifiés dans l'essai DALIA**

Le terme peptide immunodominant peut avoir deux sens. Soit il s'agit d'un peptide induisant la réponse majoritairement observée chez un individu donné, soit il s'agit d'un peptide induisant une réponse chez la majorité des individus étudiés. Nous avons utilisé cette dernière définition pour cette étude. La liste de tous les peptides 8-10 mers testés peut être retrouvée dans la publication des résultats de l'essai ANRS VAC 18 ([Salmon-Céron et al., 2010](#)).

Concernant les épitopes considérés A2 chez les volontaires de l'essai ANRS VAC 04, on remarque tout d'abord l'énorme discordance entre les épitopes décrits A2 dans la littérature et ceux prédits par NetMHCpan 4.0. Étant donné la confirmation de la liaison de ces peptides à la molécule HLA A2 par des tests biochimiques réalisés dans le laboratoire du Dr Guillet à Cochon, on peut conclure que l'efficacité de prédiction du logiciel concernant les épitopes A2 est loin d'être optimale, ce qui n'est

pas le cas pour l'ensemble des molécules HLA de classe I, comme nous avons pu le remarquer dans les résultats de l'essai ANRS DALIA (article publié dans PLOS Pathogens).

Parmi les réponses observées chez les individus A2, 1 épitope immunodominant et 3 épitopes sous-dominants sont identifiés. Tous ces épitopes, qui font partie des régions Gag 253-284 et Nef 116-145, sont reconnus aussi bien chez des patients VIH<sup>+</sup> que des volontaires sains. Cependant, l'épitope dominant Nef 137-145 est reconnu majoritairement par les LT CD8<sup>+</sup> de volontaires sains (**Tableau 22**).

Parmi les réponses observées chez les individus A24, 2 épitopes co-dominants et 1 épitope sous-dominant sont identifiés. Ces épitopes font également partie des régions Gag 253-284 et Nef 116-145. Si l'épitope co-dominant Nef 134-143 est bien reconnu par des patients VIH<sup>+</sup> et des volontaires sains, ce n'est pas le cas du deuxième épitope co-dominant Gag 276-283 qui est seulement reconnu par des volontaires sains. (**Tableau 22**)

Parmi les réponses observées chez les individus A29, 1 épitope immunodominant et 3 épitopes sous-dominants sont identifiés. Tous ces épitopes font partie des régions Gag 253-284 et Nef 116-145, et seul l'épitope dominant Nef 135-143 est reconnu aussi bien chez des patients VIH<sup>+</sup> que des volontaires sains (**Tableau 22**).

Parmi les réponses observées chez les individus A3/A11, 1 épitope immunodominant et 3 épitopes sous-dominants sont identifiés. L'épitope dominant Nef 84-92, fait partie de la région Nef 66-97 et il est reconnu aussi bien chez des patients VIH<sup>+</sup> que des volontaires sains. Les 3 épitopes sous-dominants sont reconnus par les patients VIH<sup>+</sup>. Un fait partie de la région Nef 66-97 (l'épitope Nef 73-82) tandis que les 2 autres (les épitopes Gag 18-26 et Gag 18-27), qui ne sont pas compris dans les lipopeptides injectés chez les volontaires sains de l'essai ANRS VAC 04, font partie de la région Gag 17-35 (**Tableau 22**).

Parmi les réponses observées chez les individus B27, 1 seul épitope immunodominant est identifié. Il s'agit du peptide Gag 263-272 faisant partie de la région Gag 253-284 et qui est reconnu aussi bien chez des patients VIH<sup>+</sup> que des volontaires sains (**Tableau 22**). Il s'agit d'un épitope particulièrement bien connu (KRWILGNLK ou KK10) qui permet l'induction de réponses polyfonctionnelles associées à la non-progression vers le stade SIDA ([Almeida et al., 2007](#); [Scherer et al., 2004](#); [Wilson et al., 2000](#)).

Parmi les réponses observées chez les individus du supertype B7 (B7/B35/B51/B53), 3 épitopes co-dominants (Gag 267-277, Nef 71-81, Nef 135-143) et 5 épitopes sous-dominants sont identifiés. Ils font tous partie des 3 régions vaccinales retrouvées dans les vaccins LIPO-5, LIPO-6, et LIPO-6T utilisés dans les essais cliniques analysés. Deux des épitopes sous-dominants sont exclusivement

reconnus par des patients VIH+ (Nef 74-81 et Nef 130-139) et l'épitope co-dominant Nef 71-81 est très majoritairement reconnu par des patients VIH+. (**Tableau 22**).

Enfin, parmi les réponses observées chez les individus B8, 1 épitope immunodominant faisant partie de la région Gag 253-284, et aussi bien reconnu par des patients VIH+ que des volontaires sains, est identifié. Il s'agit du peptide Gag 259-267 (**Tableau 22**).

HLA	Peptide	Epitope	Nombre de réponses totales	Nombre de réponses HIV-	Nombre de réponses HIV+	Région
A2	GAG 260-268	sous-dominant	3	2	1	Gag 253-284
A2	GAG 267-274	sous-dominant	4	3	1	Gag 253-284
A2	NEF 136-145	sous-dominant	4	2	2	Nef 116-145
<b>A2</b>	<b>NEF 137-145</b>	<b>dominant</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>Nef 116-145</b>
A24	GAG 261-270	sous-dominant	2	1	1	Gag 253-284
<b>A24</b>	<b>GAG 276-283</b>	<b>co-dominant</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>Gag 253-284</b>
<b>A24</b>	<b>NEF 134-143</b>	<b>co-dominant</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Nef 116-145</b>
A29	GAG 254-262	sous-dominant	1	1	0	Gag 253-284
A29	NEF 133-141	sous-dominant	1	1	0	Nef 116-145
A29	NEF 134-143	sous-dominant	1	0	1	Nef 116-145
<b>A29</b>	<b>NEF 135-143</b>	<b>dominant</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>Nef 116-145</b>
A3/A11	GAG 18-26	sous-dominant	2	NA	2	Gag 17-35
A3/A11	GAG 18-27	sous-dominant	2	NA	2	Gag 17-35
A3/A11	NEF 73-82	sous-dominant	2	0	2	Nef 66-97
<b>A3/A11</b>	<b>NEF 84-92</b>	<b>dominant</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>Nef 66-97</b>
<b>B27</b>	<b>GAG 263-272</b>	<b>dominant</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>Gag 253-284</b>
B7/B35/B51/B53	GAG 254-262	sous-dominant	3	1	2	Gag 253-284
<b>B7/B35/B51/B53</b>	<b>GAG 267-277</b>	<b>co-dominant</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>Gag 253-284</b>
B7/B35/B51/B53	NEF 68-76	sous-dominant	4	2	2	Nef 66-97
B7/B35/B51/B53	NEF 71-79	sous-dominant	4	2	2	Nef 66-97
<b>B7/B35/B51/B53</b>	<b>NEF 71-81</b>	<b>co-dominant</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>Nef 66-97</b>
B7/B35/B51/B53	NEF 74-81	sous-dominant	4	0	4	Nef 66-97
B7/B35/B51/B53	NEF 130-139	sous-dominant	3	0	3	Nef 116-145
<b>B7/B35/B51/B53</b>	<b>NEF 135-143</b>	<b>co-dominant</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>Nef 116-145</b>
<b>B8</b>	<b>GAG 259-267</b>	<b>dominant</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>Gag 253-284</b>

NA, non analysable ; les peptides dominants ou co-dominants sont identifiés en gras.

**Tableau 22 : Identification des épitopes T CD8<sup>+</sup> immunodominants et sous-dominants en fonction des molécules HLA chez les volontaires sains et les patients VIH+**

Si l'on réalise une analyse globale de la présence des épitopes T CD8<sup>+</sup> dominants ou non par région et par HLA (**Figure 52**), alors on constate que :

- Gag 253-284 est la seule région vaccinale induisant des réponses vis-à-vis des épitopes T CD8<sup>+</sup> restreints par les 7 molécules HLA étudiées.

- La région Gag 17-35 ne semble induire que des réponses contre des épitopes T CD8<sup>+</sup> restreints par les molécules A3/A11 (cependant aucune conclusion définitive ne peut être tirée car cette région vaccinale n'est pas contenue dans le LIPO-6 et donc n'a pas pu être évaluée chez les volontaires sains de l'essai ANRS VAC 04).

- Les LT CD8<sup>+</sup> des individus B27 ne semblent cibler que la région Gag 253-284 (l'épitope KK10), cependant aucune conclusion définitive ne peut être tirée car les réponses dirigées contre la

région vaccinale Gag 17-35, qui contient 1 épitope B27 décrit dans la littérature, n'ont pas pu être évaluées chez les volontaires sains de l'essai ANRS VAC 04 qui ont reçu le LIPO-6.

- Des réponses T CD8<sup>+</sup> sont observées vis-à-vis d'épitopes A3/A11 présents dans toutes les régions vaccinales.

	A2	A3/A11	A24	A29	B27	B7/B35/B51/B53	B8
Gag 17-35							
Gag 253-284							
Nef 66-97							
Nef 116-145							
Pol 325-333							

En gris, présence d'au moins 1 épitope ; en noir, présence d'au moins un épitope dominant.

**Figure 52 : Présence des épitopes T CD8<sup>+</sup> induisant une réponse au sein des différentes régions de LIPO-5**

Si on regarde dans le détail les 3 régions vaccinales contenant des séquences conservées du VIH-1 et communes aux différents vaccins LIPO-5, LIPO-6 et LIPO-6T (**Tableau 23**), alors on constate que :

- Nef 71-81 (HLA supertype B7) est l'épitope immunodominant de la région Nef 66-97, et cet épitope est reconnu essentiellement par les patients VIH+,

- Nef 135-143 (HLA A29 / supertype B7) est l'épitope immunodominant de la région Nef 116-145, et cet épitope est reconnu aussi bien par les patients VIH+ que les volontaires sains. De manière intéressante, les épitopes sous-dominants Nef 134-143 et Nef 137-145 sont essentiellement retrouvés respectivement chez les patients VIH+ et les volontaires sains,

- Gag 267-277 (HLA supertype B7) est l'épitope immunodominant de la région Gag 253-284, et cet épitope est reconnu aussi bien par les patients VIH+ que les volontaires sains.

Région	Peptide	Epitope	Nombre de réponses totales	Nombre de réponses HIV-	Nombre de réponses HIV+	HLA
Nef 66-97	Nef 68-76	sous-dominant	4	2	2	B7/B35/B51/B53
	Nef 71-79	sous-dominant	4	2	2	B7/B35/B51/B53
	<b>Nef 71-81</b>	<b>dominant</b>	<b>7</b>	1	<b>6</b>	<b>B7/B35/B51/B53</b>
	Nef 84-92	sous-dominant	4	2	2	A3/A11
NEF 116-145	Nef 134-143	sous-dominant	6	1	5	A24 A29 B7/35/B51/B53
	<b>Nef 135-143</b>	<b>dominant</b>	<b>11</b>	5	<b>6</b>	<b>A29</b> <b>B7/B35/B51/B53</b>
	Nef 137-145	sous-dominant	6	5	1	A2
Gag 253-284	Gag 254-262	sous-dominant	4	2	2	A29 B7/B35/B51/B53
	Gag 259-267	sous-dominant	5	3	2	B8
	Gag 260-268	sous-dominant	4	2	2	A2 B8
	Gag 267-274	sous-dominant	4	2	2	A3/A11
	<b>Gag 267-277</b>	<b>dominant</b>	<b>8</b>	5	3	<b>B7/B35/B51/B53</b>

**Tableau 23 : Identification des épitopes T CD8<sup>+</sup> immunodominants et sous-dominants en fonction des régions vaccinales chez les volontaires sains et les patients VIH+**

**Conclusions générales de la quatrième partie :**

En résumé, les peptides dominants sont en majorité les mêmes chez les patients VIH+ et les volontaires sains, même s'il existe quelques disparités. Les 3 régions (Gag 253-284, Nef 66-97 et Nef 116-145) contenues dans les vaccins LIPO-5, LIPO-6 et LIPO-6T injectés aux patients VIH+ ou aux volontaires sains contiennent des épitopes T CD8<sup>+</sup> induisant des réponses. Cependant, les régions Nef 116-145 et Gag 253-284 contiennent le plus grand nombre d'épitopes immunodominants, et la région Gag 253-284 est la seule à induire des réponses vis-à-vis d'épitopes restreints par les 7 molécules HLA étudiées. Les épitopes immunodominants identifiés dans ces 3 régions vaccinales sont restreints par les molécules HLA du supertype B7 (B7/B35/B51/B53). Cela a son importance pour 2 raisons :

1) Car la fréquence de ces molécules HLA dans la population française est élevée. En effet, plus de 28% des français sont porteurs d'une des molécules HLA du supertype B7 (**Tableau 24**). Cela permet donc d'envisager de telles réponses T CD8<sup>+</sup> chez un grand nombre de sujets vaccinés.

2) Car dans l'infection naturelle par le VIH-1, les patients du supertype B7 n'ont pas une grande capacité à induire des réponses CTL ([Scherer et al., 2004](#)). Ainsi on peut imaginer que la vaccination avec LIPO-5 pourrait permettre de mieux contrôler le virus en permettant l'induction de ces réponses CTL restreintes par la superfamille HLA B7.

Concernant les 2 régions spécifiques de LIPO-5 et LIPO-6T (Gag 17-35 et Pol 325-355) étudiées chez des patients séropositifs pour le VIH-1, il semble que la région Gag 17-35 permet seulement l'induction de réponses vis-à-vis d'épitopes T CD8<sup>+</sup> restreints par les molécules HLA A3/A11. Par contre, des réponses ciblant les épitopes Pol 325-333 (A3/A11) et Pol 342-350 (superfamille B7) ont été observées au sein de la région vaccinale Pol 325-355.

Enfin, on peut remarquer que 2 des molécules HLA les plus fréquemment portées dans la population française (A1 et B44) n'ont pas été étudiées ici (**Tableau 24**). En fait, malgré la présence de sujets portant ces molécules HLA dans les essais étudiés, seulement une réponse a été observée vis-à-vis d'un épitope A1 chez un individu de l'essai VAC 04. Cela s'explique par le fait que malheureusement les séquences vaccinales conservées de LIPO-5 ne contiennent que 2 épitopes A1 (dans la région Nef 116-145) et 1 seul épitope B44 (dans la région Pol 325-355).

	HLA A	Frequence	Rang		HLA B	Frequence	Rang
	<a href="#">France Grenoble, Nantes and Rennes (n=6094)</a>	<b>A*02</b>	<b>0,291</b>	<b>1</b>		B*44	0,162
A*01		0,132	2		<b>B*07</b>	<b>0,115</b>	<b>2</b>
<b>A*03</b>		<b>0,132</b>	<b>3</b>		<b>B*08</b>	<b>0,094</b>	<b>3</b>
<b>A*24</b>		<b>0,097</b>	<b>4</b>		<b>B*35</b>	<b>0,089</b>	<b>4</b>
<b>A*11</b>		<b>0,061</b>	<b>5</b>		<b>B*51</b>	<b>0,073</b>	<b>5</b>
<b>A*29</b>		<b>0,051</b>	<b>6</b>		B*15	0,068	6
A*32		0,04	7		B*18	0,061	7
A*68		0,038	8		B*40	0,055	8
A*26		0,034	9		B*14	0,043	9
A*30		0,031	10		<b>B*27</b>	<b>0,038</b>	<b>10</b>
A*31		0,029	11		B*57	0,025	11
A*23		0,025	12		B*49	0,024	12
A*25		0,019	13		B*39	0,022	13
A*33		0,013	14		B*38	0,02	14
A*66		0,003	15		B*13	0,019	15
A*34		0,001	16		B*55	0,018	16
A*69:01		0,001	17		B*37	0,013	17
A*74		0,001	18		B*50	0,013	18
					B*58	0,012	19
					B*56	0,008	20
					B*52	0,006	21
					<b>B*53</b>	<b>0,006</b>	<b>22</b>
					B*41:02	0,004	23
					B*45	0,004	24
					B*41:01	0,003	25
					B*47	0,003	26
	<b>Total analysées</b>	<b>0,632</b>			<b>Total analysées</b>	<b>0,415</b>	
					<b>Total #B7</b>	<b>0,283</b>	

#supertype

<http://www.allelefrequencies.net>En jaunes, molécules HLA analysées dans l'étude des réponses T CD8<sup>+</sup>**Tableau 24 : Fréquence des allèles des molécules HLA-A et HLA-B en France**

## V. Cinquième partie : Comparaison des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-VIH-1 dans différents essais vaccinaux utilisant des lipopeptides

Enfin, la caractérisation des réponses T CD4<sup>+</sup> observées après vaccination chez les patients de l'essai DALIA nous a permis, dans un **cinquième objectif**, de comparer ces réponses avec celles dirigées contre les différentes régions vaccinales conservées contenues dans LIPO-5 et retrouvées dans les essais prophylactiques ANRS VAC 04 et VAC 18 et les essais thérapeutiques LIPHTERA et ANRS 093. Le but de ce cinquième et dernier objectif était ainsi d'évaluer si l'immunodominance des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-VIH-1 pouvait également varier suivant le type de vaccin utilisé et la population ciblée.

Ce travail a été effectué non pas pour comparer directement la fréquence des individus vaccinés dans les différents essais étudiés pour lesquels des réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 ont été induites, mais pour comparer les régions ciblées par ces réponses dans chaque essai. Dans les essais ANRS VAC 04, ANRS VAC 18, LIPHTERA, et ANRS 093, la technique de prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée après stimulation de PBMC pendant 5 à 7 jours par les longs peptides correspondants aux régions vaccinales a été utilisée pour évaluer la réponse cellulaire T CD4<sup>+</sup>. Cependant, les critères de positivité de ce test ont évolué entre la réalisation des premiers essais (LIPHTERA et ANRS VAC 04) et des plus récents (ANRS 093 et VAC 18), ne permettant pas une stricte comparaison des taux de répondeurs entre tous les essais. En effet, ils sont devenus plus stringents en ajoutant au critère de positivité initial défini par un index de prolifération (nombre de coups par minute (cpm) mesuré dans les puits de cellules stimulées par l'antigène / nombre de coups par minute (cpm) mesuré dans les puits de cellules non stimulées)  $\geq 3$ , un seuil minimal de cpm de 3000 pour la détection de la radioactivité. De plus, les réponses T CD4<sup>+</sup> post-vaccinales de l'essai ANRS DALIA ont été identifiées à l'aide du test ICS après amplification des cellules mémoires décrit dans notre article publié dans PLOS Pathogens. Un récapitulatif des réponses T CD4<sup>+</sup> induites par les individus vaccinés participants à ces différents essais cliniques sont présentés dans le **tableau 25** (plus la fréquence de réponses est importante, plus elle apparaît en vert foncé dans ce tableau).

	LIPHTERA (% répondeurs après 3 injections de LIPO-6)	ANRS VAC 04 (% répondeurs après 3 injections de LIPO-6 sans QS-21)	ANRS VAC 18 (% répondeurs après 3 injections de LIPO-5)	ANRS 093 (% répondeurs après 4 injections de LIPO-6T)	ANRS DALIA-1 (% répondeurs après 4 injections de cellules dendritiques chargées avec LIPO-5)
Gag 17-35	NA	NA	5	8	64
Gag 253-284	43	45	25	28	100
Nef 66-97	9	45	2	18	50
Nef 116-145	17	9	10	12	43
Pol 325-355	NA	NA	8	25	79

NA = Non analysable car région non présente dans le vaccin testé

**Tableau 25 : Immunodominance des réponses T CD4<sup>+</sup> chez des volontaires sains et des patients VIH+ vaccinés participant à différents essais vaccinaux anti-VIH-1**

Quel que soit le vaccin lipopeptidique testé et la population ciblée, les réponses T CD4<sup>+</sup> sont majoritairement détectées vis-à-vis de la région Gag 253-284. Vient ensuite la région Pol 325-355 pour les sujets ayant reçu les vaccins LIPO-5 et LIPO-6T. On remarque que la région Gag 17-35 induit assez peu de réponses dans les essais ANRS VAC 18 et ANRS 093. Les raisons peuvent-être la nature des molécules HLA de classe II (allèles) portées par les vaccinés des différents essais qui vont uniquement permettre la liaison de certains épitopes T CD4<sup>+</sup> et donc influencer sur les réponses T CD4<sup>+</sup> détectées, et le fait que cette séquence vaccinale soit plus courte que les autres séquences conservées incluses dans LIPO-5 (19 acides aminés pour Gag 17-35 contre 30 à 32 acides aminés pour les autres séquences). Concernant les réponses aux deux régions de Nef, les résultats varient en fonction des essais et cela ne semble pas dû au vaccin ni à la sérologie VIH des individus vaccinés. La raison la plus probable de cette variation est également la nature des molécules HLA de classe II portées par les vaccinés inclus dans ces différents essais cliniques. Cependant, toutes les régions vaccinales sont capables d'induire des réponses T CD4<sup>+</sup>.

**Conclusions générales de la cinquième partie :**

En résumé, toutes les régions incluses dans le vaccin LIPO-5 contiennent des épitopes permettant l'induction de réponses T CD4<sup>+</sup>, même si le taux de répondeur peut varier en fonction de chaque région vaccinale. Comme pour les réponses T CD8<sup>+</sup>, c'est la région Gag 253-284 qui est immunodominante. Il semble donc primordial d'inclure cette région de la protéine Gag p24 dans un vaccin anti-VIH-1. Cependant, étant donné que dans l'essai ANRS DALIA, nous avons identifié des peptides 15-mers potentiellement associés à un contrôle de la charge virale pendant l'ATI dans chacune des régions conservées de LIPO-5, toutes ces régions paraissent bien importantes à inclure dans un vaccin anti-VIH-1.

# **Discussion**

## I. Que conclure des réponses cellulaires induites par les lipopeptides ?

### 1. Les réponses T CD8<sup>+</sup>

Nous avons vu que les vaccins lipopeptidiques permettent l'induction de nombreuses réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Si on compare ces réponses à celles décrites dans la littérature, on peut remarquer que parmi toutes les réponses T CD8<sup>+</sup> dirigées contre les séquences conservées du VIH-1 incluses dans le candidat vaccin LIPO-5 observées dans les différents essais analysés ici, 4 (Nef 73-82, Nef 84-92, Nef 134-141 et Nef 135-143) font partie des 9 épitopes les plus « promiscuous » décrits par Frahm et ses collègues (Frahm et al., 2007).

Nous avons également observé que 5 des épitopes du sous-type B du VIH-1 identifiés au cours de ces essais (Gag 259-267, Nef 83-91, Nef 90-97, Nef 134-143 et Nef 116-124) ont également été reconnus par des LT CD8<sup>+</sup> de patients infectés par le sous-type CRF02\_AG du VIH-1 (Inwoley et al., 2005), et 4 (Gag 254-262, Nef 128-137, Nef 135-143 et Pol 342-350) par les CTL de prostituées Kenyanes fréquemment exposées aux sous-types A, C et D du VIH-1 (Rowland-Jones et al., 1998).

De manière intéressante, l'épitope KK10 (Gag 263-272), présenté par la molécule HLA B27 et associé au contrôle de la réplication du VIH-1 (Scherer et al., 2004; Wilson et al., 2000), est inclus dans la séquence Gag 253-284 de LIPO-5. C'est d'ailleurs l'épitope immunodominant observé chez les individus vaccinés B27. Mais d'autres épitopes provenant de la protéine Gag et présentant des mutations associées à une diminution de la capacité répliquative du VIH-1 (Du et al., 2017) sont présents dans le vaccin LIPO-5. C'est le cas pour 6 épitopes de la région Gag 17-35 présentés par les molécules HLA A03, B51, B08 et B27 ; et 5 de la région Gag 253-284 présentés par les molécules HLA B62, B52, B08, B15 et B27, dont l'épitope B52 RMYSPSTSI (Gag 275-282). Même si l'allèle B52 est peu fréquent dans la population française, il est tout de même intéressant de noter que l'épitope RMYSPSTSI, présenté par cette molécule HLA, est présent dans la séquence Gag 253-284 de LIPO-5. En effet, la reconnaissance de cet épitope, qui est également inclus dans le vaccin tHIVconsvX du groupe de Tomas Hanke, par les LT CD8<sup>+</sup> d'individus B52 infectés par le VIH-1 permet l'inhibition *in vivo* de la réplication virale (Murakoshi et al., 2018).

Des épitopes de la protéine Nef du VIH-1 présentés par les molécules B27 et B57 et présentant des résidus où s'opère une pression de sélection par les LT CD8<sup>+</sup> ont également été décrits (Adland et al., 2013). De manière intéressante, 3 de ces épitopes sont présents dans la séquence Nef 116-145 incluses dans LIPO-5 (Nef 116-124, Nef 130-143 et Ne 133-141).

Enfin, parmi les 15 épitopes immunodominants présentant des mutations associées à une diminution de la capacité répliquative du VIH-1 décrits par Wang et ses collègues (Wang et al., 2009), 7 sont

présents dans LIPO-5 (1 dans Gag 17-35, 1 dans Gag 253-284, 3 dans Nef 66-97 et 2 dans Nef 116-145). Des réponses T CD8<sup>+</sup> ont été observées vis-à-vis de 4 de ces épitopes dans les essais vaccinaux étudiés dans cette thèse dont Gag 263-272 (KRWIILGLNK, réponse immunodominante B27) et Nef 74-81 (VPLRPMTY, réponse sous-dominante B35).

Ces analyses valident donc le choix des séquences incluses dans LIPO-5 et montrent que des réponses T CD8<sup>+</sup> multi-épitopiques induisant une pression de sélection sur le VIH-1 peuvent bien être induites grâce à la vaccination lipopeptidique. De plus, les épitopes T CD8<sup>+</sup> du sous-type B du VIH-1 peuvent également être reconnus par des individus infectés par d'autres sous-types du VIH-1. Cependant, comme nous l'avons vu dans la quatrième partie des résultats, certains épitopes présentés par des molécules HLA fréquentes dans la population française, comme les molécules A1 et B44, sont sous-représentés dans les séquences de LIPO-5. Cela implique donc d'inclure d'autres séquences vaccinales, d'autant plus que ces deux molécules HLA ont une faible capacité à induire des réponses CTL ([Scherer et al., 2004](#)).

## 2. Les réponses T CD4<sup>+</sup>

Parmi les réponses T CD4<sup>+</sup> observées dans les différents essais étudiés dans cette thèse, on remarque que la région Gag 253-284 est la plus immunogène. Il a été montré que cette observation pouvait être expliquée par la taille du répertoire de cellules naïves ciblant cette région ([Castelli et al., 2013](#)).

De manière intéressante, parmi les peptides ciblés par les LT CD4<sup>+</sup> associés à un contrôle de la réplication du VIH-1 décrits par Ranasinghe et ses collègues ([Ranasinghe et al., 2012](#)), le peptide Nef 81-97 et le peptide Gag 265-282 sont inclus dans le vaccin LIPO-5. D'ailleurs, il a également été observé une fréquence plus importante de LT CD4<sup>+</sup> mémoires ciblant le peptide Gag 263-282 chez les EC que chez des patients virémiques ([Vingert et al., 2010](#)).

De même, un des longs peptides utilisés dans une étude montrant l'importance des réponses prolifératives contre la protéine Nef dans la non-progression vers le stade SIDA chez des patients séropositifs pour le VIH-1 correspondait exactement à la séquence Nef 66-97 incluse dans LIPO-5 ([Pancre et al., 2007](#)).

Ces analyses, ainsi que l'identification de nouveaux épitopes T CD4<sup>+</sup> au sein des régions de Gag, Nef et Pol du VIH-1 dans l'essai DALIA valident donc également le choix des séquences incluses dans LIPO-5 et montrent que des réponses T CD4<sup>+</sup> associées au contrôle de la charge virale du VIH-1 peuvent bien être induites grâce à la vaccination lipopeptidique.

L'étude des réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> induites dans les différents essais utilisant des lipopeptides montre tout l'intérêt des régions sélectionnées pour la confection du vaccin LIPO-5. Cependant, de nombreux autres épitopes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> associés au contrôle de la réplication du VIH-1 ont été maintenant décrits et ne sont pas présents au sein des séquences de LIPO-5.

## II. Quel bilan tirer des résultats des essais effectués avec les vaccins lipopeptidiques ?

Malgré les réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> observées après vaccination dans les différents essais prophylactiques et thérapeutiques de phase I et II utilisant les lipopeptides, les résultats concernant l'immunogénicité de LIPO-5 injecté par voie intramusculaire seul ou en « boost » ont été décevants. En effet, les résultats ELISpot IFN $\gamma$  de l'essai prophylactique ANRS VRI 01 montrent que le LIPO-5 utilisé seul, ou en « boost » après un « prime » MVA, n'est pas immunogène. Les mêmes résultats avaient été observés dans le modèle macaque ([Dereuddre-Bosquet et al., 2015](#)). De même, dans l'essai HVTN 042/ANRS VAC 19, l'utilisation de LIPO-5 seul ou après un « prime » avec un ALVAC (vCP1452) ne s'était pas avéré immunogène ([Frey et al., 2014](#)). Par contre, l'utilisation de LIPO-5 en « prime » avant le « boost » MVA semble avoir eu un intérêt dans l'essai ANRS VRI01. En effet, même si la fréquence des répondeurs ne semble pas améliorée, l'étude des régions ciblées par les LT des volontaires vaccinés nous montre que l'utilisation du LIPO-5 en « prime » permet de focaliser les réponses totales sur les différentes régions conservées du VIH-1 incluses dans LIPO-5 par rapport à l'utilisation du MVA seul. De manière intéressante, cet effet du schéma vaccinal sur l'immunodominance des réponses a déjà été observé par d'autres, notamment l'équipe de James Mullins travaillant sur un vaccin anti-VIH-1 constitué de séquences conservées de la protéine Gag p24. En effet, les chercheurs de cette équipe ont observé qu'en vaccinant des singes avec leur vaccin en « prime » puis en effectuant un « boost » avec la protéine Gag entière (p55), les réponses induites observées après le « boost » étaient focalisées sur les régions conservées du vaccin alors que ce n'était pas le cas en effectuant le « prime » avec la p55 et le boost avec leur vaccin ([Kulkarni et al., 2014](#)). Cette information est importante car on sait qu'un vaccin efficace devra induire des réponses T poly-épitopiques sur des régions conservées du VIH-1 afin d'éviter que le virus n'échappe à la réponse immunitaire par ses mutations.

Dans les études de vaccination thérapeutique ANRS 093 et LIGHT, on observe que les lipopeptides associés à un ALVAC ou utilisés en « boost » après un « prime » avec un vaccin ADN ne sont pas très immunogènes. Par contre, LIPO-5 présente un intérêt majeur lorsqu'il est chargé *ex vivo* sur des cellules dendritiques dérivée de monocytes (MoDC) dans le cadre des approches de « DC targeting »

comme l'essai ANRS DALIA. En effet, dans cet essai thérapeutique, la stratégie vaccinale particulièrement immunogène a permis l'induction de réponses cellulaires contre toutes les séquences du VIH-1 conservées incluses dans LIPO-5, en particulier des réponses T CD4<sup>+</sup>. Ces réponses ont d'ailleurs permis chez certains patients de contrôler le rebond viral lors de la phase d'ATI. De manière intéressante, une étude comparant la quantité et la qualité des réponses T CD4<sup>+</sup> mémoires spécifiques de différents antigènes après stimulation par différentes APC chargées avec l'antigène avait montré la supériorité des MoDC par rapport aux monocytes ou aux PBMC à induire ces réponses (Perreau et al., 2012).

### III. Comment utiliser demain les lipopeptides ?

L'avenir des lipopeptides semble donc se trouver en priorité dans une utilisation en vaccination thérapeutique, dans le cadre d'une stratégie de « DC-targeting » *ex vivo* comme dans l'essai ANRS DALIA. Les résultats de cet essai ont d'ailleurs conduit le VRI à lancer un nouvel essai clinique de type DALIA chez l'homme. Cet essai nommé VRI 04 / DALIA-2 est un essai de phase II comparant l'utilisation de DC chargées par LIPO-5 combinée ou non avec du Poly-ICLC (agoniste du TLR3), et inclut également un bras placebo. L'intérêt de l'utilisation du Poly-ICLC est son effet sur la mobilisation du réservoir viral qui a notamment été observé lors d'une étude chez la souris humanisée (Cheng et al., 2018). Ce nouveau vaccin fait donc partie des stratégies évaluées dans la quête d'une cure fonctionnelle du VIH-1.

Cependant, aussi intéressante soit-elle, la stratégie de « DC targeting » *ex vivo* des essais DALIA ne peut apporter qu'une preuve de concept et ne saurait être utilisée à large échelle du fait de sa complexité. Le labex (laboratoire d'excellence soutenu par l'Etat dans le cadre du programme d'investissement d'avenir) auquel j'appartiens a donc mis au point des vaccins ciblant directement les cellules dendritiques et faisant appel à des anticorps dirigés contre des récepteurs présents à la surface des DC, il s'agit du « DC targeting » *in vivo* (cf p.98). Ainsi l'utilisation d'un vaccin anti-CD40-HIV5Pep, dirigé contre la protéine CD40 (présente sur les LB mais surtout les DC) et comportant les mêmes séquences peptidiques que celles présentes dans LIPO-5, a donné des résultats intéressants dans des stratégies de vaccinations thérapeutiques en terme d'immunogénicité dans le modèle macaque (Flamar et al., 2018) et d'impact sur le réservoir viral dans un modèle de souris humanisées (Cheng et al., 2018). Quelles leçons tirer des essais effectués avec les lipopeptides et comment dès lors améliorer ces nouveaux vaccins ?

#### **IV. Quelles sont les pistes pour améliorer les lipopeptides à l'avenir ?**

Même si le développement des lipopeptides a été arrêté par l'ANRS pour le moment, regardons tout de même quelles sont les pistes éventuelles pour améliorer ce type de vaccin à l'avenir mais surtout comment tirer parti des résultats obtenus avec les lipopeptides pour améliorer les nouveaux vaccins développés par l'ANRS et le VRI.

##### **1. Améliorer la construction des lipopeptides**

Si les lipopeptides monopalmytoylés sont faciles à produire, ce ne sont pas forcément les plus immunogènes. En effet, de nouvelles constructions lipopeptidiques ont maintenant été développées, et il semble que les constructions ramifiées permettent une meilleure activation des DC et l'induction de réponses cellulaires plus fortes que les constructions linéaires (Liu et al., 2016). De telles constructions pourraient être envisagées pour un vaccin lipopeptidique anti-VIH-1.

##### **2. Changer la voie d'immunisation**

Il est à noter que l'intérêt du ciblage des cellules dendritiques avait déjà été approché par les études sur les voies d'injection de l'antigène Gag p24 chez la souris (Liard et al., 2011). Ainsi une injection intradermique des lipopeptides permettant le ciblage *in vivo* des cellules de Langerhans présentes dans l'épiderme et des DC présentes dans le derme pourrait permettre une induction optimale des réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. Une étude comparant la tolérance et l'immunogénicité de lipopeptides injectés par voies intramusculaire et intradermique a d'ailleurs déjà été réalisée, cependant cette étude utilisait le vaccin LIPO-4 ne contenant que de très courtes séquences de Gag, Pol et Nef associées de façon colinéaire à l'épitope TT 830-843 de l'anatoxine tétanique. Cette étude a notamment montré qu'avec une dose de vaccin plus faible d'un facteur 5, la vaccination intradermique permettait l'induction de réponses T CD8<sup>+</sup> similaires à la vaccination intramusculaire (Launay et al., 2007; Launay et al., 2013).

Etant donné que l'infection par le VIH-1 a lieu essentiellement par voie sexuelle, l'utilisation d'une vaccination mucosale pourrait également être envisagée. Par le passé, l'étude ANRS VAC 14 a déjà évalué la tolérance d'une immunisation par les voies nasales et vaginales d'un vaccin composé de la protéine recombinante gp160 (Pialoux et al., 2008a). On sait également que des lipopeptides injectés par voie nasale peuvent être immunogènes dans les modèles CMV (BenMohamed et al., 2002a) et Influenza (Deliyannis et al., 2006) chez la souris. En effet, une administration muqueuse de vaccins lipopeptidiques pourrait avoir des avantages logistiques et économiques (BenMohamed et al.,

2002b). De plus, l'établissement d'une immunité locale muqueuse pourrait empêcher la réplication et la dissémination du VIH-1. De manière intéressante dans le modèle murin de l'herpès, il a été montré qu'une immunisation intravaginale par un lipopeptide contenant 3 acides palmitiques en « prime » suivi d'un « boost » avec un Ad5 recombinant contenant des épitopes du HSV (« herpes virus simplex ») permettait l'induction de LT CD8<sup>+</sup> protecteurs au niveau des muqueuses (Zhang et al., 2012b).

### 3. Amplifier l'effet adjuvant potentiel de la queue lipidique des lipopeptides

Même si les lipopeptides ont été initialement conçus pour être injectés sans adjuvant supplémentaire, l'utilisation d'adjuvant peut être envisagée afin d'augmenter leur immunogénicité. Lors de l'essai ANRS VAC 04, le QS-21 avait déjà été utilisé et montré un effet positif sur les réponses T CD4<sup>+</sup> observées à long terme après vaccination (Gahery-Segard et al., 2003). Le QS-21 est un extrait végétal dérivé de l'écorce de *Quillaja saponaria*. L'extrait contient des composés hydrosolubles du triterpène glycoside, qui appartiennent à une famille de composés à base de plantes appelés saponines. Il est notamment inclus dans le vaccin anti-VZV Shingrix, qui est préconisé dans la prévention du zona et des névralgies post-zostériennes (NPZ) chez les adultes de 50 ans ou plus.

Nous avons montré au cours de cette thèse qu'une vaccination lipopeptidique entraînait la sécrétion d'IL-13, une cytokine de type Th2, par des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1. Nous avons également montré que pour observer cette réponse IL-13 spécifique du VIH-1 après vaccination, les lipopeptides devaient être injectés seuls et pas après un « prime » avec d'autres vaccins entraînant plutôt des réponses de type Th1. De plus, nous avons observé que chez des patients VIH+ vaccinés, seules des DC chargées avec des lipopeptides étaient capables d'induire cette réponse Th2, probablement car chez les patients infectés par le VIH-1, l'activation chronique du système immunitaire induit un environnement de type Th1 qui ne permet pas *in vivo* aux DC d'induire une polarisation de type Th2, comme cela peut être le cas avec des DC activées et maturées *in vitro*. De manière intéressante, dans l'essai DALIA, nous avons observé une corrélation négative entre l'étendue et l'intensité de la réponse IL-13 après vaccination et la charge virale plasmatique maximale en phase ATI. Même si l'IL-13 n'est pas une cytokine particulièrement étudiée dans le domaine du VIH, nous avons déjà montré la présence de réponses IL-13 chez des volontaires sains vaccinés par LIPO-5 (Richert et al., 2013). Il a récemment été montré qu'un profil cytokinique Th2 était associé à une efficacité vaccinale dans des essais de vaccinations prophylactiques réalisés aussi bien chez le macaque (Vaccari et al., 2018) que chez l'homme (Sauce et al., 2016). De plus, il a été montré que l'IL-13 pouvait inhiber la production de VIH-1 dans des macrophages (Montaner et al., 1993) et que l'IL-13 et l'IFN $\gamma$  sécrétés

par des LT de patients séropositifs pour le VIH-1 étaient associés avec la suppression virale et l'absence de progression de la maladie (Bailer et al., 1999). Enfin, il a également été montré que des HESN produisaient de l'IL-13 (Ruiz-Riol et al., 2015). L'IL-13 induite par une vaccination lipopeptidique pourrait donc représenter un corrélât de contrôle de la réplication virale, même si ce dernier ne peut pas forcément être généralisé à d'autres types de vaccins, comme nous l'avons montré dans cette thèse. Ces résultats ouvrent vers deux perspectives :

1) l'utilisation d'ELISpot IL-13 dans le monitoring des futurs essais de vaccination anti-VIH-1. En effet, à ce jour les tests ELISpot IFN $\gamma$  classiquement utilisés dans l'immunomonitoring des essais vaccinaux (Streeck et al., 2009) n'ont pas permis de mettre en évidence un corrélât de contrôle de la réplication du VIH-1.

2) l'utilisation d'adjuvants susceptibles d'induire une réponse IL13. L'hypothèse principale pouvant expliquer la sécrétion d'IL-13 que nous avons observée est la stimulation du TLR2 par les lipopeptides. En effet, il a été montré que des lipopeptides pouvaient polariser la réponse immunitaire vers un profil Th2 en activant le TLR2 (Halliday et al., 2016; Redecke et al., 2004). De nombreux adjuvants, notamment des ligands de TLR, sont désormais disponibles pour une utilisation chez l'homme (Gutjahr et al., 2016) et des études comparatives devront être effectuées afin de choisir le meilleur adjuvant pouvant induire des réponses post-vaccinales associées au contrôle de la réplication du VIH-1. En effet, il a été montré dans le modèle macaque que l'utilisation de différents adjuvants pouvait générer des différences très importantes dans la quantité et la qualité des réponses immunitaires induites (Francica et al., 2017) et influencer sur la protection vaccinale observée (Vaccari et al., 2016).

#### **4. Revoir les séquences à inclure dans le vaccin**

##### ***i. Remarques sur les séquences incluses dans LIPO-5***

L'étude des réponses cellulaires induites par les candidats vaccins étudiés dans cette thèse et utilisant différents lipopeptides nous a permis d'observer que les différentes régions sélectionnées permettaient l'induction de réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, Gag 253-284 étant la région immunodominante concernant les 2 types de réponses. De plus, certains peptides 15-mers (immunodominants ou pas) provenant des régions vaccinales Gag, Pol et Nef semblent associés au contrôle du rebond viral pendant l'ATI dans l'essai DALIA. Si ces résultats sont encourageants, ils peuvent sans doute encore être améliorés en incluant de nouvelles séquences au vaccin.

Le choix des séquences à inclure dans un vaccin, en particulier dans un vaccin contre un virus comme le VIH-1 qui mute beaucoup et qui s'adapte au HLA des populations (Avila-Rios et al., 2019), est un

élément primordial pour une efficacité vaccinale maximale. Depuis de nombreuses années, les connaissances concernant le VIH, en particulier l'impact des réponses T CD8<sup>+</sup> impliquées dans le contrôle de la charge virale et dans l'échappement viral se sont multipliées. Il semble donc maintenant évident qu'une nouvelle sélection de régions poly-épitopiques permettra une amélioration de l'immunogénicité des vaccins constitués de lipopeptides. LIPO-5 est constitué de 5 séquences du VIH-1 représentant seulement 144 acides aminés au total, soit environ 4,5% du total des protéines exprimées par le VIH-1. Même si ce sont des séquences conservées, elles sont certainement trop peu nombreuses pour induire des réponses T CD8<sup>+</sup> ayant une influence sur le contrôle de la charge virale du VIH-1. En effet, malgré la détection de LT CD8<sup>+</sup> exprimant des molécules cytotoxiques et sécrétant de l'IFN $\gamma$  dans l'essai DALIA, ces réponses ne semblent pas associées au contrôle du rebond viral observé en phase d'ATI chez certains patients vaccinés. Il semble donc important de rajouter des séquences afin de couvrir une partie plus importante des 15 protéines du virus. La question est de savoir quelles séquences rajouter : des séquences conservées entre les différents sous-types de VIH-1, associées à un contrôle du virus chez les EC et les LTNP, ou des séquences cibles de mutations impactant la capacité répliquative du virus ? Je pense que cela va dépendre du type de vaccin.

### ***ii. Intérêt des logiciels de prédictions épitopiques***

Malgré leurs performances honorables, je pense que les logiciels de prédiction de l'affinité de liaison entre peptides et molécules HLA ne seront pas forcément utiles pour aider à faire une sélection des épitopes à inclure dans un vaccin visant à induire des réponses T contre le VIH-1. En effet, comme nous l'avons vu dans l'étude DALIA, peu de peptides prédits pour se lier aux molécules HLA de classe I sont vraiment des épitopes ciblés par les LT CD8<sup>+</sup> des vaccinés. Les logiciels de prédiction s'améliorent en incorporant également les prédictions de clivage du protéasome ou encore l'efficacité de transport des peptides par les TAP afin de mieux prédire les épitopes T CD8<sup>+</sup> ([Stranzl et al., 2010](#)). Cependant, on sait que certains épitopes ne sont pas générés par le protéasome mais plutôt par des peptidases cellulaires et que les épitopes générés peuvent même dépendre du type cellulaire ([Boucau and Le Gall, 2018](#)). Concernant les épitopes T CD4<sup>+</sup>, nous avons vu également que les prédictions n'étaient pas optimales. Mais le plus important est que ces logiciels ne peuvent pas prédire les épitopes conservés parmi les différents sous-types du VIH-1, ou associés à un meilleur contrôle de la charge virale, ou encore les épitopes dont une mutation va engendrer un changement dans la capacité répliquative du VIH-1. Ce sont bien ces derniers facteurs les plus importants à prendre en considération pour la sélection des séquences à inclure dans un vaccin cellulaire anti-VIH-1.

### ***iii. Choix des séquences pour un vaccin préventif***

Concernant plus particulièrement le vaccin prophylactique, je pense que les séquences vaccinales choisies ne doivent pas forcément correspondre aux séquences conservées observées dans des virus de différents sous-types chez des patients infectés en phase chronique. En effet, il faut cibler le virus responsable de l'infection, le « transmitted/founder virus », avant qu'il ne mute trop et se diversifie. D'ailleurs, de manière intéressante, si les réponses T CD8<sup>+</sup> dirigées contre la protéine Env sont généralement associées à une charge virale élevée en phase chronique de l'infection (Kiepiela et al., 2007), la présence de ces réponses chez des individus vaccinés par différents candidats vaccins semble associée à leur protection contre l'infection par le VIH-1 (Barouch et al., 2018; Janes et al., 2017). Pour cela, en plus d'épitopes spécifiques de la protéine Env, je pense qu'il faut se concentrer sur tous les épitopes T CD8<sup>+</sup> dont une mutation peut diminuer la capacité répliquative du VIH-1 (Gorin et al., 2017) et inclure des séquences contenant ces résidus dans le vaccin afin d'éviter un échappement à la réponse immunitaire par le VIH-1. De telles séquences ont été identifiées dans les protéines Gag (Du et al., 2017; Miura et al., 2009), Pol (Herzig et al., 2015; Rawle et al., 2018), Nef (Adland et al., 2013). Une étude a même identifié différents épitopes immunodominants de Gag, Pol, Nef et Env contenant une mutation de ce type associée aux molécules HLA (Wang et al., 2009). L'inclusion de séquences de la protéine Nef pourrait également permettre la sélection de mutants empêchant spécifiquement la fonction de diminution de l'expression des molécules HLA de classe I médiée par cette protéine (Lewis et al., 2012). Il faut cibler également les protéines qui vont être exprimées rapidement par les cellules infectées comme la protéine Gag qui est exprimée avant même l'intégration de l'ADN proviral et la synthèse des protéines du VIH-1 (Buseyne et al., 2001; Kloverpris et al., 2013; Sacha et al., 2007) mais également celles qui sont produites et exprimées rapidement par la cellule infectée comme les protéines Tat et Rev. En effet, Tat et Rev sont fréquemment ciblées par les CTL des patients séropositifs pour le VIH-1 (Addo et al., 2001) et la fréquence des CTL dirigés contre ces 2 protéines a été inversement corrélée à la progression rapide vers la phase SIDA (vanBaalen et al., 1997).

### ***iv. Choix des séquences pour un vaccin thérapeutique***

Concernant plus particulièrement le vaccin thérapeutique, je pense qu'il faut se concentrer sur des séquences conservées contenant des épitopes T CD8<sup>+</sup> pouvant se retrouver chez de nombreux patients infectés (Murakoshi et al., 2015; Murakoshi et al., 2018; Perez et al., 2008; Perez et al., 2013; Zou et al., 2019). En effet la population virale étant déjà diversifiée, il va falloir se focaliser sur l'induction et l'intensification de réponses de forte avidité fonctionnelle. Ces réponses sont

majoritairement retrouvées vis-à-vis de la protéine Gag (Berger et al., 2011; Julg et al., 2010; Mothe et al., 2012) mais peuvent également impliquer d'autres protéines comme la protéine Env (Leitman et al., 2017). De plus, même s'il est maintenant clairement établi que certaines molécules HLA de classe I sont associées au contrôle de la réplication du VIH-1, ces molécules sont impliquées dans des réponses T CD8<sup>+</sup> vis-à-vis de régions conservées du VIH-1 dont la mutation va engendrer une diminution de la capacité répliquative du virus (Wang et al., 2009). Les épitopes associés à un meilleur contrôle de la réplication virale (Pereyra et al., 2014; Streeck et al., 2014) doivent donc être sélectionnés, et ce pour un grand nombre d'haplotypes différents, afin que le vaccin soit efficace pour le plus grand nombre de patients possible. De manière intéressante, une étude très récente utilisant la topologie structurale a permis de définir quels étaient ces épitopes protecteurs, même chez des individus ne possédant pas de molécules HLA associées au contrôle de la réplication du VIH-1 (Gaiha et al., 2019). Je pense que cette étude très importante va pouvoir permettre une sélection plus pertinente des épitopes T CD8<sup>+</sup> à inclure dans les prochains vaccins.

Une autre stratégie à considérer est la sélection de séquences retrouvées par technologie NGS (« next-generation sequencing ») au sein des cellules « réservoirs » contenant du provirus intégré qui va engendrer le rebond viral et donc important à cibler par les CTL (Tumiotto et al., 2017). Une telle stratégie pourrait être envisagée pour développer des vaccins thérapeutiques personnalisés pour chaque patient infecté par le VIH-1. Cependant cette stratégie serait évidemment difficilement applicable à grande échelle (Fleury et al., 2018). Par contre la récente étude Provir/Latitude 45, réalisée chez des patients de plusieurs régions du monde, a ainsi permis d'identifier par cette technologie 15 épitopes conservés du VIH-1 (notamment au sein de la protéine Pol) potentiellement intéressants à inclure dans un vaccin thérapeutique (Tumiotto et al., 2019). De manière intéressante, parmi ces épitopes, Nef 134-143, Pol 325-333 et Pol 330-338 sont inclus dans LIPO-5. Une des limites de cette technologie est tout de même que les épitopes soient possiblement identifiés au sein de séquences de provirus défectifs, car elle ne permet pas d'identifier quels sont les virus qui se répliqueront de nouveaux après l'interruption du traitement antirétroviral.

Bien sûr il ne faudra pas laisser de côté les réponses T CD4<sup>+</sup> qui sont très importantes dans le contrôle de la réplication du VIH-1, comme nous l'avons montré dans l'essai ANRS DALIA mais comme beaucoup de données de la littérature nous le montrent aussi (Boaz et al., 2003; Boaz et al., 2002; Dyer et al., 2008; Frater et al., 2014; Gloster et al., 2004; Pancré et al., 2007; Rosenberg et al., 1997; Schieffer et al., 2014). L'inclusion dans un vaccin de certains épitopes T CD4<sup>+</sup> de Gag p17 et p24 (Ranasinghe et al., 2012) et notamment de l'épitope T CD4<sup>+</sup> Gag 293-312 (FRDYVDRFYKTLRAEQASQE) de p24, immunodominant chez les EC (Benati et al., 2016; Galperin et al., 2018; Vingert et al., 2010), paraît une priorité absolue.

Après avoir choisi les séquences, il faudra trouver le bon moyen de les agencer dans un vaccin afin que les épitopes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> contenus dans les régions choisies soient bien présentés aux LT et puissent induire des réponses effectrices. Il est ainsi possible de jouer sur les résidus flanquant les épitopes T CD8<sup>+</sup> afin qu'ils soient générés de façon majoritaire lors de l'apprêtement de l'antigène (Le Gall et al., 2007; Steers et al., 2014) ou encore sur les résidus flanquant les épitopes T CD4<sup>+</sup> qui peuvent permettre d'augmenter l'affinité du TCR pour le peptide et donc l'activation du LT CD4<sup>+</sup> (Holland et al., 2015).

### 5. Combiner les interventions thérapeutiques

Enfin, dans le but d'arriver à la cure fonctionnelle ou même pourquoi pas à l'éradication du VIH-1 de l'organisme, il faudra associer un vaccin thérapeutique immunogène à des immunomodulateurs tels que des cytokines comme l'IL-7 ou l'IL-15. En effet, l'IL-7 permet d'inhiber l'activité des Treg (Younas et al., 2013) qui peuvent empêcher l'induction de réponses optimales par la vaccination, comme cela a d'ailleurs été observé dans l'essai DALIA (Brezar et al., 2015). L'IL-15 est également une cytokine prometteuse. En effet, il a très récemment été montré que cette cytokine permettait d'augmenter l'activité antivirale des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 chez des patients infectés sous ART (Angin et al., 2019). La combinaison de vaccin thérapeutique avec des « immune checkpoint inhibitors » comme les anti-PD1 est aussi envisagée au vu des résultats prometteurs observés sur les réponses T CD8<sup>+</sup> chez des macaques infectés par un VIS et traités en phase chronique par un anticorps anti-PD1 (Velu et al., 2009). Enfin la combinaison de vaccin avec des agents de réversion de la latence virale comme le sont également les ligands de TLR, en particulier les agonistes de TLR3 et TLR7, est également prévue suite aux résultats intéressants observés sur le contrôle de la réplication virale dans les modèles murins (Cheng et al., 2018) et simiens (Borducchi et al., 2016), respectivement.

# **Conclusion**

Même si le développement de la stratégie lipopeptidique menée par l'ANRS depuis les années 1990 n'est plus à l'ordre du jour actuellement, nous venons de voir que l'immunogénicité de ces lipopeptides pourrait tout de même certainement être améliorée par différents moyens.

Si les nouveaux vaccins développés par l'ANRS et le VRI, en particulier la stratégie « DC targeting » *in vivo*, restent la priorité, je pense que la stratégie lipopeptide a encore un avenir dans la vaccination contre le VIH-1 à condition d'optimiser les constructions et les schémas vaccinaux. Même s'il est évident que le passage en phase clinique des candidats vaccins actuels nécessite beaucoup de ressources, je pense qu'il faut absolument continuer le développement et l'optimisation de candidats vaccins anti-VIH-1 dans une perspective à plus long terme.

En effet, ce qui est vrai en termes d'amélioration pour la stratégie lipopeptide l'est aussi pour la plupart des autres candidats vaccins ayant pour but l'induction de réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. Je suis ainsi persuadé qu'une meilleure sélection des séquences du VIH-1 à inclure dans ces vaccins et l'utilisation d'un adjuvant adéquat permettra l'induction de réponses cellulaires optimales.

L'utilisation de ces vaccins basés sur les épitopes T pourra alors être envisagée avec succès en vaccination préventive, en association avec d'autres candidats vaccins capables de générer des anticorps neutralisants à large spectre, mais également des anticorps à fonction ADCC et ADCP.

Ces vaccins pourront également bien sûr être utilisés en vaccination thérapeutique en les associant avec des immunomodulateurs tels que des cytokines (IL-7, IL-15), des « immune checkpoint inhibitors » (anti-PD1, anti-PDL1) ou encore des agents de réversion de la latence virale comme les agonistes de TLR (agonistes de TLR3 et TLR7). Ils pourront ainsi certainement permettre un contrôle de la charge virale dans la durée et donc une rémission à long terme chez les patients infectés par le VIH-1, voire peut-être même l'éradication du VIH-1.

**Références**  
**bibliographiques**

- Abdelwahab, S.F., Cocchi, F., Bagley, K.C., Kamin-Lewis, R., Gallo, R.C., DeVico, A., and Lewis, G.K. (2003). HIV-1-suppressive factors are secreted by CD4+ T cells during primary immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 15006-15010.
- Abdool Karim, Q., Abdool Karim, S.S., Frohlich, J.A., Grobler, A.C., Baxter, C., Mansoor, L.E., Kharsany, A.B.M., Sibeko, S., Mlisana, K.P., Omar, Z., *et al.* (2010). Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. *Science* *329*, 1168-1174.
- Ackerman, M.E., Crispin, M., Yu, X., Baruah, K., Boesch, A.W., Harvey, D.J., Dugast, A.-S., Heizen, E.L., Ercan, A., Choi, I., *et al.* (2013). Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *Journal of Clinical Investigation* *123*, 2183-2192.
- Ackerman, M.E., Mikhailova, A., Brown, E.P., Dowell, K.G., Walker, B.D., Bailey-Kellogg, C., Suscovich, T.J., and Alter, G. (2016). Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLOS Pathogens* *12*, e1005315.
- Adams, N.M., O'Sullivan, T.E., Geary, C.D., Karo, J.M., Amezcua, R.A., Joshi, N.S., Kaech, S.M., and Sun, J.C. (2016). NK Cell Responses Redefine Immunological Memory. *The Journal of Immunology* *197*, 2963-2970.
- Addo, M.M., Altfeld, M., Rosenberg, E.S., Eldridge, R.L., Philips, M.N., Habeeb, K., Khatri, A., Brander, C., Robbins, G.K., Mazzara, G.P., *et al.* (2001). The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals. *P Natl Acad Sci USA* *98*, 1781-1786.
- Adland, E., Carlson, J.M., Paioni, P., Kløverpris, H., Shapiro, R., Ogwu, A., Riddell, L., Luzzi, G., Chen, F., Balachandran, T., *et al.* (2013). Nef-Specific CD8+ T Cell Responses Contribute to HIV-1 Immune Control. *PLoS ONE* *8*, e73117.
- Ahmad, F., Hong, H.S., Jackel, M., Jablonka, A., Lu, I.N., Bhatnagar, N., Eberhard, J.M., Bollmann, B.A., Ballmaier, M., Zielinska-Skowronek, M., *et al.* (2014). High Frequencies of Polyfunctional CD8(+) NK Cells in Chronic HIV-1 Infection Are Associated with Slower Disease Progression. *Journal of Virology* *88*, 12397-12408.
- Ahmed, T., Borthwick, N.J., Gilmour, J., Hayes, P., Dorrell, L., and Hanke, T. (2016). Control of HIV-1 replication in vitro by vaccine-induced human CD8+ T cells through conserved subdominant Pol epitopes. *Vaccine* *34*, 1215-1224.
- Alessandri-Gradt, E., De Oliveira, F., Leoz, M., Lemee, V., Robertson, D.L., Feyertag, F., Ngoupo, P.A., Mauclere, P., Simon, F., and Plantier, J.C. (2018). HIV-1 group P infection: towards a dead-end infection? *Aids* *32*, 1317-1322.
- Allen, T.M., Altfeld, M., Geer, S.C., Kalife, E.T., Moore, C., O'Sullivan, K.M., DeSouza, I., Feeney, M.E., Eldridge, R.L., Maier, E.L., *et al.* (2005). Selective Escape from CD8+ T-Cell Responses Represents a Major Driving Force of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Sequence Diversity and Reveals Constraints on HIV-1 Evolution. *Journal of Virology* *79*, 13239-13249.
- Allen, T.M., O'Connor, D.H., Jing, P., Dzuris, J.L., Mothé, B.R., Vogel, T.U., Dunphy, E., Liebl, M.E., Emerson, C., Wilson, N., *et al.* (2000). Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* *407*, 386-390.
- Allers, K., Hutter, G., Hofmann, J., Lodenkemper, C., Rieger, K., Thiel, E., and Schneider, T. (2011). Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood* *117*, 2791-2799.
- Almeida, J.R., Price, D.A., Papagno, L., Arkoub, Z.A., Sauce, D., Bornstein, E., Asher, T.E., Samri, A., Schnuriger, A., Theodorou, I., *et al.* (2007). Superior control of HIV-1 replication by CD8(+) T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *Journal of Experimental Medicine* *204*, 2473-2485.
- Almeida, J.R., Sauce, D., Price, D.A., Papagno, L., Shin, S.Y., Moris, A., Larsen, M., Pancino, G., Douek, D.C., Autran, B., *et al.* (2009). Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* *113*, 6351-6360.
- Alter, G., Heckerman, D., Schneidewind, A., Fadda, L., Kadie, C.M., Carlson, J.M., Oniangue-Ndza, C., Martin, M., Li, B., Khakoo, S.I., *et al.* (2011). HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* *476*, 96-100.
- Alter, G., Teigen, N., T Davis, B., Addo, M.M., Suscovich, T.J., Waring, M.T., Streeck, H., Johnston, M.N., Staller, K.D., Zaman, M.T., *et al.* (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* *106*, 3366-3369.
- Ameisen, J.C. (1992). Programmed Cell-Death and Aids - from Hypothesis to Experiment. *Immunology Today* *13*, 388-391.

- Amella, C.A., Sherry, B., Shepp, D.H., and Schmidtayerova, H. (2005). Macrophage Inflammatory Protein 1 Inhibits Postentry Steps of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection via Suppression of Intracellular Cyclic AMP. *Journal of Virology* *79*, 5625-5631.
- Andersson, J., Kinloch, S., Sönnnerborg, A., Nilsson, J., Fehniger, Thomas E., Spetz, A.L., Behbahani, H., Goh, L.E., McDade, H., Gazzard, B., *et al.* (2002). Low Levels of Perforin Expression in CD8+T Lymphocyte Granules in Lymphoid Tissue during Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *185*, 1355-1358.
- Andres, C., Plana, M., Guardo, A.C., Alvarez-Fernandez, C., Climent, N., Gallart, T., Leon, A., Clotet, B., Autran, B., Chomont, N., *et al.* (2015). HIV-1 Reservoir Dynamics after Vaccination and Antiretroviral Therapy Interruption Are Associated with Dendritic Cell Vaccine-Induced T Cell Responses. *Journal of Virology* *89*, 9189-9199.
- Andrieu, M., Desoutter, J.F., Loing, E., Gaston, J., Hanau, D., Guillet, J.G., and Hosmalin, A. (2003). Two Human Immunodeficiency Virus Vaccinal Lipopeptides Follow Different Cross-Presentation Pathways in Human Dendritic Cells. *Journal of Virology* *77*, 1564-1570.
- Andrieu, M., Loing, E., Desoutter, J.-F., Connan, F., Choppin, J., Gras-Masse, H., Hanau, D., Dautry-Varsat, A., Guillet, J.-G., and Hosmalin, A. (2000). Endocytosis of an HIV-derived lipopeptide into human dendritic cells followed by class I-restricted CD8+ T lymphocyte activation. *European Journal of Immunology* *30*, 3256-3265.
- Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Lecuroux, C., Monceaux, V., Dillies, M.-A., Valle-Casuso, J.C., Pancino, G., Vaslin, B., Le Grand, R., *et al.* (2019). Metabolic plasticity of HIV-specific CD8+ T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nature Metabolism* *1*, 704-716.
- Appay, V., Fastenackels, S., Katlama, C., Ait-Mohand, H., Schneider, L., Guihot, A., Keller, M., Grubeck-Loebenstein, B., Simon, A., Lambotte, O., *et al.* (2011). Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *Aids* *25*, 1813-1822.
- Appay, V., Hansasuta, P., Sutton, J., Schrier, R.D., Wong, J.K., Furtado, M., Havlir, D.V., Wolinsky, S.M., McMichael, A.J., Richman, D.D., *et al.* (2002a). Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression. *Aids* *16*, 161-170.
- Appay, V., and Kelleher, A.D. (2016). Immune activation and immune aging in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS* *11*, 242-249.
- Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M.A., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M.L., Conlon, C., Spina, C.A., *et al.* (2000). HIV-Specific Cd8+T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *The Journal of Experimental Medicine* *192*, 63-76.
- Appay, V., and Rowland-Jones, S.L. (2002). Premature ageing of the immune system: the cause of AIDS? *Trends in Immunology* *23*, 580-585.
- Appay, V., and Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *The Journal of Pathology* *214*, 231-241.
- Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., *et al.* (2002b). Characterization of CD4+ CTLs Ex Vivo. *The Journal of Immunology* *168*, 5954-5958.
- Arthur, L.O., Bess, J.W., Urban, R.G., Strominger, J.L., Morton, W.R., Mann, D.L., Henderson, L.E., and Benveniste, R.E. (1995). Macaques Immunized with Hla-Dr Are Protected from Challenge with Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology* *69*, 3117-3124.
- Autran, B. (2015). Toward a cure for HIV-Seeking effective therapeutic vaccine strategies. *European Journal of Immunology* *45*, 3215-3221.
- Autran, B., Carcelain, G., Combadiere, B., and Debre, P. (2004). Therapeutic Vaccines for Chronic Infections. *Science* *305*, 205-208.
- Avila-Rios, S., Carlson, J.M., John, M., Mallal, S., and Brumme, Z.L. (2019). Clinical and evolutionary consequences of HIV adaptation to HLA: implications for vaccine and cure. *Current Opinion in Hiv and Aids* *14*, 194-204.
- Baba, T.W., Liska, V., Khimani, A.H., Ray, N.B., Dailey, P.J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M.F., McClure, H.M., Martin, L.N., *et al.* (1999). Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nature Medicine* *5*, 194-203.

- Back, N.K.T., Smit, L., De Jong, J.-J., Keulen, W., Schutten, M., Goudsmit, J., and Tersmette, M. (1994). An N-Glycan within the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 V3 Loop Affects Virus Neutralization. *Virology* 199, 431-438.
- Baeten, J.M., Palanee-Phillips, T., Brown, E.R., Schwartz, K., Soto-Torres, L.E., Govender, V., Mgodhi, N.M., Matovu Kiweewa, F., Nair, G., Mhlanga, F., *et al.* (2016). Use of a Vaginal Ring Containing Dapivirine for HIV-1 Prevention in Women. *New England Journal of Medicine* 375, 2121-2132.
- Bailer, R.T., Holloway, A., Sun, J.W., Margolick, J.B., Martin, M., Kostman, J., and Montaner, L.J. (1999). IL-13 and IFN-gamma secretion by activated T cells in HIV-1 infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. *J Immunol* 162, 7534-7542.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Banga, R., Procopio, F.A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., Corpataux, J.-M., de Leval, L., Pantaleo, G., and Perreau, M. (2016). PD-1+ and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nature Medicine* 22, 754-761.
- Barouch, D.H., Tomaka, F.L., Wegmann, F., Stieh, D.J., Alter, G., Robb, M.L., Michael, N.L., Peter, L., Nkolola, J.P., Borducchi, E.N., *et al.* (2018). Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19). *The Lancet* 392, 232-243.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-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* 220, 868-871.
- Barre-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature Reviews Microbiology* 11, 877-883.
- Barrow, A.D., Martin, C.J., and Colonna, M. (2019). The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Frontiers in Immunology* 10.
- Baum, L.L., Cassutt, K.J., Knigge, K., Khattri, R., Margolick, J., Rinaldo, C., Kleeberger, C.A., Nishanian, P., Henrard, D.R., and Phair, J. (1996). HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* 157, 2168-2173.
- Benati, D., Galperin, M., Lambotte, O., Gras, S., Lim, A., Mukhopadhyay, M., Nouël, A., Campbell, K.-A., Lemerrier, B., Claireaux, M., *et al.* (2016). Public T cell receptors confer high-avidity CD4 responses to HIV controllers. *Journal of Clinical Investigation* 126, 2093-2108.
- BenMohamed, L., Krishnan, R., Auge, C., Primus, J.F., and Diamond, D.J. (2002a). Intranasal administration of a synthetic lipopeptide without adjuvant induces systemic immune responses. *Immunology* 106, 113-121.
- BenMohamed, L., Wechsler, S.L., and Nesburn, A.B. (2002b). Lipopeptide vaccines - yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis* 2, 425-431.
- Berger, C.T., Frahm, N., Price, D.A., Mothe, B., Ghebremichael, M., Hartman, K.L., Henry, L.M., Brenchley, J.M., Ruff, L.E., Venturi, V., *et al.* (2011). High-Functional-Avidity Cytotoxic T Lymphocyte Responses to HLA-B-Restricted Gag-Derived Epitopes Associated with Relative HIV Control. *Journal of Virology* 85, 9334-9345.
- Berkley, S.F., and Koff, W.C. (2007). Scientific and policy challenges to development of an AIDS vaccine. *The Lancet* 370, 94-101.
- Berman, P.W., Gregory, T.J., Riddle, L., Nakamura, G.R., Champe, M.A., Porter, J.P., Wurm, F.M., Hershberg, R.D., Cobb, E.K., and Eichberg, J.W. (1990). Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* 345, 622-625.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., *et al.* (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8(+) T cells. *Blood* 107, 4781-4789.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* 17, 189-220.
- Biswas, P., Poli, G., Orenstein, J.M., and Fauci, A.S. (1994). Cytokine-mediated induction of human immunodeficiency virus (HIV) expression and cell death in chronically infected U1 cells: do tumor necrosis factor alpha and gamma interferon selectively kill HIV-infected cells? *Journal of Virology* 68, 2598-2604.

- Blaak, H., van't Wout, A.B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E., and Schuitemaker, H. (2000). In vivo HIV-1 infection of CD45RA+CD4+ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4+ T cell decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 1269-1274.
- Blackbourn, D.J., Mackewicz, C.E., Barker, E., Hunt, T.K., Herndier, B., Haase, A.T., and Levy, J.A. (1996). Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8(+) cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *P Natl Acad Sci USA* *93*, 13125-13130.
- Blanchet, F.P., Moris, A., Nikolic, D.S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., Wu, L., *et al.* (2010). Human Immunodeficiency Virus-1 Inhibition of Immunoamphisomes in Dendritic Cells Impairs Early Innate and Adaptive Immune Responses. *Immunity* *32*, 654-669.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology* *31*, 443-473.
- Boaz, M.J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P.J., D'Sousa, E., Van Wheelley, C., and Vyakarnam, A. (2003). CD4 responses to conserved HIV-1 T helper epitopes show both negative and positive associations with virus load in chronically infected subjects. *Clin Exp Immunol* *134*, 454-463.
- Boaz, M.J., Waters, A., Murad, S., Easterbrook, P.J., and Vyakarnam, A. (2002). Presence of HIV-1 gag-specific IFN-gamma+IL-2(+) and CD28(+)/IL-2(+) CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* *169*, 6376-6385.
- Borducchi, E.N., Cabral, C., Stephenson, K.E., Liu, J.Y., Abbink, P., Ng'ang'a, D., Nkolola, J.P., Brinkman, A.L., Peter, L., Lee, B.C., *et al.* (2016). Ad26/MVA therapeutic vaccination with TLR7 stimulation in SIV-infected rhesus monkeys. *Nature* *540*, 284-287.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., and Oldstone, M.B.A. (1994). Virus-Specific CD8+ Cytotoxic T-Lymphocyte Activity Associated with Control of Viremia in Primary Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Infection. *Journal of Virology* *68*, 6103-6110.
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X.P., Horwitz, M.S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J.A., Gairin, J.E., Hahn, B.H., Oldstone, M.B.A., *et al.* (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine* *3*, 205-211.
- Borthwick, N., Ahmed, T., Ondondo, B., Hayes, P., Rose, A., Ebrahimsa, U., Hayton, E.-J., Black, A., Bridgeman, A., Rosario, M., *et al.* (2014). Vaccine-elicited Human T Cells Recognizing Conserved Protein Regions Inhibit HIV-1. *Molecular Therapy* *22*, 464-475.
- Boucau, J., and Le Gall, S. (2018). Antigen processing and presentation in HIV infection. *Molecular Immunology*.
- Bouillot, M., Choppin, J., Cornille, F., Martinon, F., Papo, T., Gomard, E., Fourniezalwski, M.C., and Levy, J.P. (1989). Physical Association between Mhc Class-I Molecules and Immunogenic Peptides. *Nature* *339*, 473-475.
- Boulware, D.R., Hullsiek, K.H., Puronen, C.E., Rupert, A., Baker, J.V., French, M.A., Bohjanen, P.R., Novak, R.M., Neaton, J.D., and Sereti, I. (2011). Higher Levels of CRP, D-dimer, IL-6, and Hyaluronic Acid Before Initiation of Antiretroviral Therapy (ART) Are Associated With Increased Risk of AIDS or Death. *The Journal of Infectious Diseases* *203*, 1637-1646.
- Bourgault, I., Chirat, F., Tartar, A., Levy, J.P., Guillet, J.G., and Venet, A. (1994). Simian Immunodeficiency Virus as a Model for Vaccination against Hiv - Induction in Rhesus Macaques of Gag-Specific or Nef-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes by Lipopeptides. *J Immunol* *152*, 2530-2537.
- Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., *et al.* (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* *12*, 1365-1371.
- Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., *et al.* (2004). CD4+T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine* *200*, 749-759.
- Brezar, V., Hani, L., Surenaud, M., Hubert, A., Lacabartz, C., Lelievre, J.D., Levy, Y., and Seddiki, N. (2017). Negative modulation of suppressive HIV-specific regulatory T cells by IL-2 adjuvanted therapeutic vaccine. *Plos Pathogens* *13*.

- Brezar, V., Ruffin, N., Richert, L., Surenaud, M., Lacabaratz, C., Palucka, K., Thiebaut, R., Banchereau, J., Levy, Y., and Seddiki, N. (2015). Decreased HIV-Specific T-Regulatory Responses Are Associated with Effective DC-Vaccine Induced Immunity. *Plos Pathogens* *11*.
- Briggs, J.A.G., Simon, M.N., Gross, I., Kräusslich, H.-G., Fuller, S.D., Vogt, V.M., and Johnson, M.C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nature Structural & Molecular Biology* *11*, 672-675.
- Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Amraoui, S., Malbec, M., Richard, L., Bourdic, K., Donahue, D.A., Lorin, V., Casartelli, N., Noel, N., *et al.* (2016). Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. *Nat Commun* *7*.
- Brunet, J.B., Bouvet, E., Chaperon, J., Gluckman, J.C., Kernbaum, S., Klatzmann, D., Lachiver, D., Leibowitch, J., Mayaud, C., Picard, O., *et al.* (1983). Acquired Immunodeficiency Syndrome in France. *Lancet* *1*, 700-701.
- Buchbinder, S.P., Mehrotra, D.V., Duerr, A., Fitzgerald, D.W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P.B., Lama, J.R., 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.
- Burke, D.S. (1993). Vaccine Therapy for HIV - a Historical Review of the Treatment of Infectious-Diseases by Active Specific Immunization with Microbe-Derived Antigens. *Vaccine* *11*, 883-891.
- Burr, T., Hyman, J.M., and Myers, G. (2001). The origin of acquired immune deficiency syndrome: Darwinian or Lamarckian? *Philos T Roy Soc B* *356*, 877-887.
- Buseyne, F., Le Gall, S., Boccaccio, C., Abastado, J.P., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Riviere, Y., Heard, J.M., and Schwartz, O. (2001). MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nature Medicine* *7*, 344-349.
- Buseyne, F., McChesney, M., Porrot, F., Kovarik, S., Guy, B., and Rivière, Y. (1993). Gag-specific cytotoxic T lymphocytes from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: Gag epitopes are clustered in three regions of the p24gag protein. *Journal of Virology* *67*, 694-702.
- Butler, A.L., Fischinger, S., and Alter, G. (2019). The Antibiodiome—Mapping the Humoral Immune Response to HIV. *Current HIV/AIDS Reports* *16*, 169-179.
- Bwayo, J., Plummer, F., Omari, M., Mutere, A., Moses, S., Ndinyaachola, J., Kreiss, J., and Velentgas, P. (1994). Human-Immunodeficiency-Virus Infection in Long-Distance Truck Drivers in East-Africa. *Arch Intern Med* *154*, 1391-1396.
- Byrareddy, S.N., Arthos, J., Cicala, C., Villinger, F., Ortiz, K.T., Little, D., Sidell, N., Kane, M.A., Yu, J., Jones, J.W., *et al.* (2016). Sustained virologic control in SIV+ macaques after antiretroviral and  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 antibody therapy. *Science* *354*, 197-202.
- Cao, Y., Cartwright, E.K., Silvestri, G., and Perelson, A.S. (2018). CD8+ lymphocyte control of SIV infection during antiretroviral therapy. *PLOS Pathogens* *14*, e1007350.
- Carcelain, G., and Autran, B. (2013). Immune interventions in HIV infection. *Immunological Reviews* *254*, 355-371.
- Carrington, M., and O'Brien, S.J. (2003). The Influence of HLA Genotype on AIDS. *Annual Review of Medicine* *54*, 535-551.
- Carswell, J.W., Lloyd, G., and Howells, J. (1989). Prevalence of Hiv-1 in East-African Lorry Drivers. *Aids* *3*, 759-761.
- Cartwright, Emily K., Spicer, L., Smith, S.A., Lee, D., Fast, R., Paganini, S., Lawson, Benton O., Nega, M., Easley, K., Schmitz, Joern E., *et al.* (2016). CD8 + Lymphocytes Are Required for Maintaining Viral Suppression in SIV-Infected Macaques Treated with Short-Term Antiretroviral Therapy. *Immunity* *45*, 656-668.
- Casado, C., Marrero-Hernández, S., Márquez-Arce, D., Pernas, M., Marfil, S., Borràs-Grañana, F., Olivares, I., Cabrera-Rodríguez, R., Valera, M.-S., de Armas-Rillo, L., *et al.* (2018). Viral Characteristics Associated with the Clinical Nonprogressor Phenotype Are Inherited by Viruses from a Cluster of HIV-1 Elite Controllers. *mBio* *9*.
- Caskey, M., Klein, F., and Nussenzweig, M.C. (2019). Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. *Nature Medicine* *25*, 547-553.
- Castelli, F.A., Szely, N., Olivain, A., Casartelli, N., Grygar, C., Schneider, A., Besse, A., Levy, Y., Schwartz, O., and Maillere, B. (2013). Hierarchy of CD4 T Cell Epitopes of the ANRS Lipo5 Synthetic Vaccine Relies on the Frequencies of Pre-Existing Peptide-Specific T Cells in Healthy Donors. *J Immunol* *190*, 5757-5763.
- CDC (1981a). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California. *Morbidity and Mortality Weekly Report* *30*, 305-308.

- CDC (1981b). Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 30, 1-3.
- CDC (1982a). Opportunistic Infections and Kaposi's Sarcoma among Haitians in the United States *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31, 353-354, 360-361.
- CDC (1982b). Persistent, Generalized Lymphadenopathy among Homosexual Males. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31, 249-251.
- CDC (1982c). Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31, 365-367.
- CDC (1982d). Possible Transfusion-Associated Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) - California. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31, 652-654.
- CDC (1983). Immunodeficiency among Female Sexual Partners of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) - New York *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31, 697-698.
- Chan, W.L., Rodgers, A., Hancock, R.D., Taffs, F., Kitchin, P., Farrar, G., and Liew, F.Y. (1992). Protection in Simian Immunodeficiency Virus Vaccinated Monkeys Correlates with Anti-Hla Class-I Antibody-Response. *Journal of Experimental Medicine* 176, 1203-1207.
- Chen, H., Ndhlovu, Z.M., Liu, D., Porter, L.C., Fang, J.W., Darko, S., Brockman, M.A., Miura, T., Brumme, Z.L., Schneidewind, A., *et al.* (2012). TCR clonotypes modulate the protective effect of HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Nature Immunology* 13, 691-700.
- Chen, Y., Wang, S., and Lu, S. (2014). DNA Immunization for HIV Vaccine Development. *Vaccines* 2, 138-159.
- Cheng, L., Wang, Q., Li, G.M., Banga, R., Ma, J.P., Yu, H.S., Yasui, F., Zhang, Z., Pantaleo, G., Perreau, M., *et al.* (2018). TLR3 agonist and CD40-targeting vaccination induces immune responses and reduces HIV-1 reservoirs. *Journal of Clinical Investigation* 128, 4387-4396.
- Chevalier, M.F., Julg, B., Pyo, A., Flanders, M., Ranasinghe, S., Soghoian, D.Z., Kwon, D.S., Rychert, J., Lian, J., Muller, M.I., *et al.* (2010). HIV-1-Specific Interleukin-21+ CD4+ T Cell Responses Contribute to Durable Viral Control through the Modulation of HIV-Specific CD8+ T Cell Function. *Journal of Virology* 85, 733-741.
- Chiodi, F., and Weiss, R.A. (2014). Human immunodeficiency virus antibodies and the vaccine problem. *Journal of Internal Medicine* 275, 444-455.
- Chitnis, A., Rawls, D., and Moore, J. (2000). Origin of HIV Type 1 in Colonial French Equatorial Africa? *AIDS Research and Human Retroviruses* 16, 5-8.
- Choi, D.J., Dube, S., Spicer, T.P., Slade, H.B., Jensen, F.C., and Poiesz, B.J. (1997). HIV type 1 isolate Z321, the strain used to make a therapeutic HIV type 1 immunogen, is intersubtype recombinant. *Aids Research and Human Retroviruses* 13, 357-361.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., *et al.* (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine* 15, 893-900.
- Choppin, J. (2008). De l'immunologie fondamentale au développement de la vaccinologie. *médecine/sciences* 24, 56-60.
- Choppin, J., Martinon, F., Connan, F., Gomard, E., and Levy, J.P. (1991a). HLA-binding regions of HIV-1 proteins. I. Detection of seven HLA binding regions in the HIV-1 Nef protein. *J Immunol* 147, 569-574.
- Choppin, J., Martinon, F., Connan, F., Pauchard, M., Gomard, E., and Levy, J.P. (1991b). HLA-binding regions of HIV-1 proteins. II. A systematic study of viral proteins. *J Immunol* 147, 575-583.
- Chun, T.-W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., *et al.* (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
- Chun, T.W., Justement, J.S., Moir, S., Hallahan, C.W., Ehler, L.A., Liu, S., McLaughlin, M., Dybul, M., Mican, J.M., and Fauci, A.S. (2001). Suppression of HIV replication in the resting CD4+ T cell reservoir by autologous CD8+ T cells: Implications for the development of therapeutic strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 253-258.

- Chung, A.W., Ghebremichael, M., Robinson, H., Brown, E., Choi, I., Lane, S., Dugast, A.S., Schoen, M.K., Rolland, M., Suscovich, T.J., *et al.* (2014). Polyfunctional Fc-Effector Profiles Mediated by IgG Subclass Selection Distinguish RV144 and VAX003 Vaccines. *Science Translational Medicine* 6, 228ra238-228ra238.
- Chung, Amy W., Kumar, Manu P., Arnold, Kelly B., Yu, Wen H., Schoen, Matthew K., Dunphy, Laura J., Suscovich, Todd J., Frahm, N., Linde, C., Mahan, Alison E., *et al.* (2015). Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. *Cell* 163, 988-998.
- Chung, A.W., Mabuka, J.M., Ndlovu, B., Licht, A., Robinson, H., Ramlakhan, Y., Ghebremichael, M., Reddy, T., Goulder, P.J.R., Walker, B.D., *et al.* (2018). Viral control in chronic HIV-1 subtype C infection is associated with enrichment of p24 IgG1 with Fc effector activity. *Aids* 32, 1207-1217.
- Clavel, F., Guetard, D., Brunvezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santosferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., *et al.* (1986). Isolation of a New Human Retrovirus from West-African Patients with Aids. *Science* 233, 343-346.
- Clumeck, N., Sonnet, J., Taelman, H., Cran, S., Henrivaux, P., and Desmyter, J. (1984). Acquired Immune Deficiency Syndrome in Belgium and Its Relation to Central Africa. *Annals of the New York Academy of Sciences* 437, 264-269.
- Cobb, A., Roberts, L.K., Palucka, A.K., Mead, H., Montes, M., Ranganathan, R., Burkeholder, S., Finholt, J.P., Blankenship, D., King, B., *et al.* (2011). Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine. *J Immunol Methods* 365, 27-37.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzinodemo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). Identification of Rantes, Mip-1-Alpha, and Mip-1-Beta as the Major Hiv-Suppressive Factors Produced by Cd8(+) T-Cells. *Science* 270, 1811-1815.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Lu, W., Popovic, M., Latinovic, O., Sajadi, M.M., Redfield, R.R., Lafferty, M.K., Galli, M., Garzino-Demo, A., *et al.* (2012). Soluble factors from T cells inhibiting X4 strains of HIV are a mixture of chemokines and RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 5411-5416.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Yarchoan, R., Redfield, R., Cleghorn, F., Blattner, W.A., Garzino-Demo, A., Colombini-Hatch, S., Margolis, D., and Gallo, R.C. (2000). Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13812-13817.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., *et al.* (1986). New Name for AIDS Virus - What to Call the AIDS Virus. *Nature* 321, 10-10.
- Cohen, K.W., and Frahm, N. (2017). Current views on the potential for development of a HIV vaccine. *Expert Opinion on Biological Therapy* 17, 295-303.
- Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., and Haynes, B.F. (2011). Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine* 364, 1943-1954.
- Colby, D.J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., Rolland, M., Takata, H., Buranapraditkun, S., Intasan, J., *et al.* (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nature Medicine* 24, 923-926.
- Collège des Enseignants d'Immunologie (2018). *Immunologie fondamentale et immunopathologie* (Elsevier Masson).
- Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D., and Baltimore, D. (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391, 397-401.
- Connor, R.I., Korber, B.T.M., Graham, B.S., Hahn, B.H., Ho, D.D., Walker, B.D., Neumann, A.U., Vermund, S.H., Mestecky, J., Jackson, S., *et al.* (1998). Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *Journal of Virology* 72, 1552-1576.
- Couillin, I., Culmann-penciolelli, B., Gomard, E., Choppin, J., Levy, J.P., Guillet, J.G., and Saragosti, S. (1994). Impaired Cytotoxic T-Lymphocyte Recognition Due to Genetic Variations in the Main Immunogenic Region of the Human-Immunodeficiency-Virus-1 Nef Protein. *Journal of Experimental Medicine* 180, 1129-1134.
- Crome, S.Q., Lang, P.A., Lang, K.S., and Ohashi, P.S. (2013). Natural killer cells regulate diverse T cell responses. *Trends in Immunology* 34, 342-349.
- Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nature Reviews Immunology* 15, 231-242.

- Crowe, S.R., Turner, S.J., Miller, S.C., Roberts, A.D., Rappolo, R.A., Doherty, P.C., Ely, K.H., and Woodland, D.L. (2003). Differential Antigen Presentation Regulates the Changing Patterns of CD8+ T Cell Immunodominance in Primary and Secondary Influenza Virus Infections. *The Journal of Experimental Medicine* *198*, 399-410.
- Cubas, R.A., Mudd, J.C., Savoye, A.-L., Perreau, M., van Grevenynghe, J., Metcalf, T., Connick, E., Meditz, A., Freeman, G.J., Abesada-Terk, G., *et al.* (2013). Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature Medicine* *19*, 494-499.
- Cuevas, M.T., Ruibal, I., Villahermosa, M.L., Díaz, H., Delgado, E., Parga, E.V.-d., Pérez-Álvarez, L., de Armas, M.B., Cuevas, L., Medrano, L., *et al.* (2002). High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *Aids* *16*, 1643-1653.
- Culmann-Penciolelli, B., Lamhamedi-Cherradi, S., Couillin, I., Guegan, N., Levy, J.P., Guillet, J.G., and Gomard, E. (1994). Identification of multirestricted immunodominant regions recognized by cytolytic T lymphocytes in the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *Journal of Virology* *68*, 7336-7343.
- Curtis, T. (1992). The origin of AIDS. In *Rolling Stones*
- D'Costa, L.J., Plummer, F., Bowmer, I., Fransen, L., Piot, P., Ronald, A.R., and Nsanze, H. (1985). Prostitutes are a major reservoir of sexually transmitted diseases in Nairobi, Kenya. *Sexually Transmitted Diseases* *12*, 64-67.
- D'arc, M., Ayoub, A., Esteban, A., Learn, G.H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F.H., Boesch, C., *et al.* (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, E1343-E1352.
- D'Souza, M., Fontenot, A.P., Mack, D.G., Lozupone, C., Dillon, S., Meditz, A., Wilson, C.C., Connick, E., and Palmer, B.E. (2007). Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4+ T Cells Is Driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction. *The Journal of Immunology* *179*, 1979-1987.
- da Silva, L.T., Santillo, B.T., de Almeida, A., Duarte, A.J.d.S., and Oshiro, T.M. (2018). Using Dendritic Cell-Based Immunotherapy to Treat HIV: How Can This Strategy be Improved? *Frontiers in Immunology* *9*.
- Daniel, M., Letvin, N., King, N., Kannagi, M., Sehgal, P., Hunt, R., Kanki, P., Essex, M., and Desrosiers, R. (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* *228*, 1201-1204.
- Daniel, M.D., Kirchhoff, F., Czajak, S.C., Sehgal, P.K., and Desrosiers, R.C. (1992). Protective Effects of a Live Attenuated SIV Vaccine with a Deletion in the Nef Gene. *Science* *258*, 1938-1941.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350-354.
- De Cock, K.M., Hamilton, W., Weiss, R.A., and Wain-Hobson, S. (2001). Epidemiology and the emergence of human immunodeficiency virus and acquired immune deficiency syndrome. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* *356*, 795-798.
- de Jong, W., Aerts, J., Allard, S., Brander, C., Buyze, J., Florence, E., van Gorp, E., Vanham, G., Leal, L., Mothe, B., *et al.* (2019). iHIVARNA phase IIa, a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial to evaluate the safety and immunogenicity of iHIVARNA-01 in chronically HIV-infected patients under stable combined antiretroviral therapy. *Trials* *20*.
- De Leys, R., Vanderborgh, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., and Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *Journal of Virology* *64*, 1207-1216.
- De Sousa, J.D., Alvarez, C., Vandamme, A.-M., and Müller, V. (2012). Enhanced Heterosexual Transmission Hypothesis for the Origin of Pandemic HIV-1. *Viruses* *4*, 1950-1983.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludfordmenting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., *et al.* (1995). Genomic Structure of an Attenuated Quasi-Species of HIV-1 from a Blood-Transfusion Donor and Recipients. *Science* *270*, 988-991.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., *et al.* (1996). Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the *CCR5* Structural Gene. *Science* *273*, 1856-1862.

- Deeks, S.G., Kitchen, C.M., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narváez, A.B., Hunt, P., Martin, J.N., Kahn, J.O., Levy, J., *et al.* (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* *104*, 942-947.
- Delany-Moretlwe, S., Lombard, C., Baron, D., Bekker, L.-G., Nkala, B., Ahmed, K., Sebe, M., Brumskine, W., Nchabeleng, M., Palanee-Philips, T., *et al.* (2018). Tenofovir 1% vaginal gel for prevention of HIV-1 infection in women in South Africa (FACTS-001): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases* *18*, 1241-1250.
- Deliyannis, G., Kedzierska, K., Lau, Y.F., Zeng, W.G., Turner, S.J., Jackson, D.C., and Brown, L.E. (2006). Intranasal lipopeptide primes lung-resident memory CD8(+) T cells for long-term pulmonary protection against influenza. *European Journal of Immunology* *36*, 770-778.
- Deprez, B., Sauzet, J.P., Boutillon, C., Martinon, F., Tartar, A., Sergheraert, C., Guillet, J.G., Gomard, E., and Gras-Masse, H. (1996). Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine* *14*, 375-382.
- Deres, K., Schild, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., and Rammensee, H.-G. (1989). In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* *342*, 561-564.
- Dereuddre-Bosquet, N., Baron, M.-L., Contreras, V., Gosse, L., Mangeot, I., Martinon, F., Yousfi, R., Clayette, P., Levy, Y., and Le Grand, R. (2015). HIV specific responses induced in nonhuman primates with ANRS HIV-Lipo-5 vaccine combined with rMVA-HIV prime or boost immunizations. *Vaccine* *33*, 2354-2359.
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabaratz, C., Levy, Y., Schwartz, O., *et al.* (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* *543*, 564-567.
- DeVico, A.L., and Gallo, R.C. (2004). Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nature Reviews Microbiology* *2*, 401-413.
- Djoko, C.F., Wolfe, N.D., Aghokeng, A.F., LeBreton, M., Liegeois, F., Tamoufe, U., Schneider, B.S., Ortiz, N., Mbacham, W.F., Carr, J.K., *et al.* (2012). Failure to Detect Simian Immunodeficiency Virus Infection in a Large Cameroonian Cohort with High Non-human Primate Exposure. *EcoHealth* *9*, 17-23.
- Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K.G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M.L., Hebbeler, A.M., and Greene, W.C. (2010). Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell* *143*, 789-801.
- Doitsh, G., and Greene, Warner C. (2016). Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host & Microbe* *19*, 280-291.
- Dolin, R., Graham, B.S., Greenberg, S.B., Tacket, C.O., Belshe, R.B., Midthun, K., Clements, M.L., Gorse, G.J., Horgan, B.W., Atmar, R.L., *et al.* (1991). The Safety and Immunogenicity of a Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 (Hiv-1) Recombinant Gp160 Candidate Vaccine in Humans. *Annals of Internal Medicine* *114*, 119-127.
- Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., *et al.* (2009). Breadth of Human Immunodeficiency Virus-Specific Neutralizing Activity in Sera: Clustering Analysis and Association with Clinical Variables. *Journal of Virology* *84*, 1631-1636.
- Douek, D.C., Brenchley, J.M., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Okamoto, Y., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Kunstman, K., Wolinsky, S., *et al.* (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* *417*, 95-98.
- Draenert, R., Le Gall, S., Pfafferott, K.J., Leslie, A.J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E.C., Chang, S.-C., Feeney, M.E., Addo, M.M., *et al.* (2004). Immune Selection for Altered Antigen Processing Leads to Cytotoxic T Lymphocyte Escape in Chronic HIV-1 Infection. *The Journal of Experimental Medicine* *199*, 905-915.
- du Bois, R.M., Branthwaite, M.A., Mikhail, J.R., and Batten, J.C. (1981). Primary Pneumocystis Carinii and Cytomegalovirus Infections. *The Lancet* *318*, 1339.
- Du, Y.S., Zhang, T.H., Dai, L., Zheng, X.J., Gorin, A.M., Oishi, J., Wu, T.T., Yoshizawa, J.M., Li, X.M., Yang, O.O., *et al.* (2017). Effects of Mutations on Replicative Fitness and Major Histocompatibility Complex Class I Binding Affinity Are Among the Determinants Underlying Cytotoxic-T-Lymphocyte Escape of HIV-1 Gag Epitopes. *Mbio* *8*.
- DuPage, M., and Bluestone, J.A. (2016). Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology* *16*, 149-163.

- Dyer, W.B., Zaunders, J.J., Yuan, F., Wang, B., Learmont, J.C., Geczy, A.F., Saksena, N.K., McPhee, D.A., Gorry, P.R., and Sullivan, J.S. (2008). Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* 5, 112.
- Edwards, B.H., Bansal, A., Sabbaj, S., Bakari, J., Mulligan, M.J., and Goepfert, P.A. (2002). Magnitude of Functional CD8+ T-Cell Responses to the Gag Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Correlates Inversely with Viral Load in Plasma. *Journal of Virology* 76, 2298-2305.
- Elahi, S., Dinges, W.L., Lejarcegui, N., Laing, K.J., Collier, A.C., Koelle, D.M., McElrath, M.J., and Horton, H. (2011). Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. *Nature Medicine* 17, 989-995.
- Elsaesser, H., Sauer, K., and Brooks, D.G. (2009). IL-21 Is Required to Control Chronic Viral Infection. *Science* 324, 1569-1572.
- Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J.L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A.T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362, 359-362.
- Emini, E.A., Schleif, W.A., Nunberg, J.H., Conley, A.J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S.D., Matsushita, S., Cobb, K.E., Jett, C.M., *et al.* (1992). Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* 355, 728-730.
- Engelhard (1994). Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology* 1, 13-23.
- Etienne, L., Hahn, Beatrice H., Sharp, Paul M., Matsen, Frederick A., and Emerman, M. (2013). Gene Loss and Adaptation to Hominids Underlie the Ancient Origin of HIV-1. *Cell Host & Microbe* 14, 85-92.
- Excler, J.-L., and Kim, J.H. (2019). Novel prime-boost vaccine strategies against HIV-1. *Expert Review of Vaccines*, 1-15.
- Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pèpin, J., *et al.* (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346, 56-61.
- Fauci, A.S. (2017). An HIV Vaccine Is Essential for Ending the HIV/AIDS Pandemic. *Jama* 318, 1535.
- Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., Heldebrandt, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S.H., *et al.* (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors. *Aids* 17, 1871-1879.
- Filippone, C., de Oliveira, F., Betsem, E., Schaeffer, L., Fontanet, A., Lemée, V., Gessain, A., and Plantier, J.-C. (2017). Simian Immunodeficiency Virus seroreactivity in inhabitants from rural Cameroon frequently in contact with non-human primates. *Virology* 503, 76-82.
- Finkel, T.H., Tudor-Williams, G., Banda, N.K., Cotton, M.F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., and Kupfer, A. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine* 1, 129-134.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., *et al.* (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295-1300.
- Fischer, E., Rieux, V., Guillet, J.G., and Kazatchkine, M. (2005). The human immunodeficiency virus preventive vaccine research at the French National Agency for acquired immunodeficiency syndrome research. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 79-84.
- Fischer, W., Perkins, S., Theiler, J., Bhattacharya, T., Yusim, K., Funkhouser, R., Kuiken, C., Haynes, B., Letvin, N.L., Walker, B.D., *et al.* (2007). Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nature Medicine* 13, 100-106.
- Flamar, A.L., Bonnabau, H., Zurawski, S., Lacabaratz, C., Montes, M., Richert, L., Wiedemann, A., Galmin, L., Weiss, D., Cristillo, A., *et al.* (2018). HIV-1 T cell epitopes targeted to Rhesus macaque CD40 and DCIR: A comparative study of prototype dendritic cell targeting therapeutic vaccine candidates. *Plos One* 13.
- Fletcher, C.V., Staskus, K., Wietgreffe, S.W., Rothenberger, M., Reilly, C., Chipman, J.G., Beilman, G.J., Khoruts, A., Thorkelson, A., Schmidt, T.E., *et al.* (2014). Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 2307-2312.

- Fleury, H., Tumiotto, C., Bellecave, P., and Recordon-Pinson, P. (2018). Therapeutic Vaccine Against HIV, Viral Variability, Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes, and Genetics of Patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* *34*, 27-30.
- Flynn, N.M., Forthal, D.N., Harro, C.D., Judson, F.N., Mayer, K.H., Para, M.F., and Group., r.H.V.S. (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.
- Fonteneau, J.F., Larsson, M., Beignon, A.S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells and Concomitantly Induces the Bystander Maturation of Myeloid Dendritic Cells. *Journal of Virology* *78*, 5223-5232.
- Forthal, D.N., Landucci, G., and Daar, E.S. (2001). Antibody from Patients with Acute Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection Inhibits Primary Strains of HIV Type 1 in the Presence of Natural-Killer Effector Cells. *Journal of Virology* *75*, 6953-6961.
- Fortin, J.-F., Barat, C., Beauséjour, Y., Barbeau, B., and Tremblay, M.J. (2004). Hyper-responsiveness to Stimulation of Human Immunodeficiency Virus-infected CD4+T Cells Requires Nef and Tat Virus Gene Products and Results from Higher NFAT, NF- $\kappa$ B, and AP-1 Induction. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 39520-39531.
- Fowke, K.R., Nagelkerke, N.J.D., Kimani, J., Simonsen, J.N., Anzala, A.O., Bwayo, J.J., MacDonald, K.S., Ngugi, E.N., and Plummer, F.A. (1996). Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *The Lancet* *348*, 1347-1351.
- Frahm, N., Yusim, K., Suscovich, T.J., Adams, S., Sidney, J., Hrabec, P., Hewitt, H.S., Linde, C.H., Kavanagh, D.G., Woodberry, T., *et al.* (2007). Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. *European Journal of Immunology* *37*, 2419-2433.
- Francica, J.R., Zak, D.E., Linde, C., Siena, E., Johnson, C., Juraska, M., Yates, N.L., Gunn, B., De Gregorio, E., Flynn, B.J., *et al.* (2017). Innate transcriptional effects by adjuvants on the magnitude, quality, and durability of HIV envelope responses in NHPs. *Blood Advances* *1*, 2329-2342.
- Frankel, A.D., and Young, J.A.T. (1998). HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry* *67*, 1-25.
- Frater, J., Ewings, F., Hurst, J., Brown, H., Robinson, N., Fidler, S., Babiker, A., Weber, J., Porter, K., Phillips, R.E., *et al.* (2014). HIV-1-specific CD4(+) responses in primary HIV-1 infection predict disease progression. *Aids* *28*, 699-708.
- Freel, S.A., Picking, R.A., Ferrari, G., Ding, H., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Kirchherr, J.L., Soderberg, K.A., Weinhold, K.J., Cunningham, C.K., *et al.* (2012). Initial HIV-1 Antigen-Specific CD8+ T Cells in Acute HIV-1 Infection Inhibit Transmitted/Founder Virus Replication. *Journal of Virology* *86*, 6835-6846.
- Frey, S.E., Peiperl, L., McElrath, M.J., Kalams, S., Goepfert, P.A., Keefer, M.C., Baden, L.R., Lally, M.A., Mayer, K., Blattner, W.A., *et al.* (2014). Phase I/II Randomized Trial of Safety and Immunogenicity of LIPO-5 Alone, ALVAC-HIV (vCP1452) Alone, and ALVAC-HIV (vCP1452) Prime/LIPO-5 Boost in Healthy, HIV-1-Uninfected Adult Participants. *Clinical and Vaccine Immunology* *21*, 1589-1599.
- Furci, L., Scarlatti, G., Burastero, S., Tambussi, G., Colognesi, C., Quillent, C., Longhi, R., Loverro, P., Borgonovo, B., Gaffi, D., *et al.* (1997). Antigen-driven C-C Chemokine-mediated HIV-1 Suppression by CD4+T Cells from Exposed Uninfected Individuals Expressing the Wild-type CCR-5 Allele. *The Journal of Experimental Medicine* *186*, 455-460.
- Gahery-Segard, H., Pialoux, G., Charmeteau, B., Sermet, S., Poncelet, H., Raux, M., Tartar, A., Levy, J.P., Gras-Masse, H., and Guillet, J.G. (2000). Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *Journal of Virology* *74*, 1694-1703.
- Gahery-Segard, H., Pialoux, G., Figueiredo, S., Igea, C., Surenaud, M., Gaston, J., Gras-Masse, H., Levy, J.P., and Guillet, J.G. (2003). Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide-vaccine: Characterization of CD8(+)-T-cell epitopes recognized. *Journal of Virology* *77*, 11220-11231.
- Gahery, H., Choppin, J., Bourgault, I., Fischer, E., Maillere, B., and Guillet, J.G. (2005). HIV preventive vaccine research at the ANRS: The lipopeptide vaccine approach. *Therapie* *60*, 243-248.
- Gahery, H., Daniel, N., Charmeteau, B., Ourth, L., Jackson, A., Andrieu, M., Choppin, J., Salmon, D., Pialoux, G., and Guillet, J.G. (2006). New CD4(+) and CD8(+)-T cell responses induced in chronically HIV type-1-infected patients after immunizations with an HIV type 1 lipopeptide vaccine. *Aids Research and Human Retroviruses* *22*, 684-694.

- Gahery, H., Figueiredo, S., Texier, C., Pouvelle-Moratille, S., Ourth, L., Igea, C., Surenaud, M., Guillet, J.-G., and Maillere, B. (2007). HLA-DR-Restricted Peptides Identified in The Nef Protein Can Induce HIV Type 1-Specific IL-2/IFN- $\gamma$ -Secreting CD4+ And CD4+ /CD8+ T Cells in Humans after Lipopeptide Vaccination. *AIDS Research and Human Retroviruses* *23*, 427-437.
- Gaiha, G.D., Rossin, E.J., Urbach, J., Landeros, C., Collins, D.R., Nwonu, C., Muzhingi, I., Anahtar, M.N., Waring, O.M., Piechocka-Trocha, A., *et al.* (2019). Structural topology defines protective CD8+ T cell epitopes in the HIV proteome. *Science* *364*, 480-484.
- Gallo, R., Salahuddin, S., Popovic, M., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B., Palker, T., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., *et al.* (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* *224*, 500-503.
- Galperin, M., Farenc, C., Mukhopadhyay, M., Jayasinghe, D., Decroos, A., Benati, D., Tan, L.L., Ciacchi, L., Reid, H.H., Rossjohn, J., *et al.* (2018). CD4<sup>+</sup> T cell-mediated HLA class II cross-restriction in HIV controllers. *Science Immunology* *3*, eaat0687.
- Galvin, S.R., and Cohen, M.S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature Reviews Microbiology* *2*, 33-42.
- García, F., Climent, N., Assoumou, L., Gil, C., González, N., Alcamí, J., León, A., Romeu, J., Dalmau, J., Martínez-Picado, J., *et al.* (2011). A Therapeutic Dendritic Cell-Based Vaccine for HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *203*, 473-478.
- Garcia, F., Climent, N., Guardo, A.C., Gil, C., Leon, A., Autran, B., Lifson, J.D., Martinez-Picado, J., Dalmau, J., Clotet, B., *et al.* (2013). A Dendritic Cell-Based Vaccine Elicits T Cell Responses Associated with Control of HIV-1 Replication. *Science Translational Medicine* *5*, 166ra162-166ra162.
- Gautam, R., Nishimura, Y., Gaughan, N., Gazumyan, A., Schoofs, T., Buckler-White, A., Seaman, M.S., Swihart, B.J., Follmann, D.A., Nussenzweig, M.C., *et al.* (2018). A single injection of crystallizable fragment domain-modified antibodies elicits durable protection from SHIV infection. *Nature Medicine* *24*, 610-616.
- Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M.C., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Buckler-White, A., Sadjadpour, R., Wang, K., *et al.* (2016). A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature* *533*, 105-109.
- Geijtenbeek, T.B.H., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H.A., Nottet, H.S.L.M., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* *100*, 587-597.
- Gerstoft, J., Malchow-moller, A., Bygbjerg, I., Dickmeiss, E., Enk, C., Halberg, P., Haahr, S., Jacobsen, M., Jensen, K., Mejer, J., *et al.* (1982). Severe Acquired Immunodeficiency in European Homosexual Men. *Brit Med J* *285*, 17-19.
- Getchell, J.P., Hickst, D.R., Svinivasan, A., Heath, J.L., York, D.A., Malonga, M., Forthal, D.N., Mann, J.M., and McCormick, J.B. (1987). Human Immunodeficiency Virus Isolated from a Serum Sample Collected in 1976 in Central Africa. *Journal of Infectious Diseases* *156*, 833-836.
- Giorgi, J.V., and Detels, R. (1989). T-Cell Subset Alterations in Hiv-Infected Homosexual Men - Niaid Multicenter Aids Cohort Study. *Clin Immunol Immunop* *52*, 10-18.
- Girard, M.P., Osmanov, S., Assossou, O.M., and Kieny, M.-P. (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine* *29*, 6191-6218.
- Gloster, S.E., Newton, P., Cornforth, D., Lifson, J.D., Williams, I., Shaw, G.M., and Borrow, P. (2004). Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *Aids* *18*, 749-755.
- Gondois-Rey, F., Chéret, A., Granjeaud, S., Mallet, F., Bidaut, G., Lécuroux, C., Ploquin, M., Müller-Trutwin, M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoël, V., *et al.* (2017). NKG2C+ memory-like NK cells contribute to the control of HIV viremia during primary infection: Optiprim-ANRS 147. *Clinical & Translational Immunology* *6*, e150.
- Goodbourn, S., Randall, R.E., and Didcock, L. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology* *81*, 2341-2364.
- Goonetilleke, N., Liu, M.K.P., Salazar-Gonzalez, J.F., Ferrari, G., Giorgi, E., Ganusov, V.V., Keele, B.F., Learn, G.H., Turnbull, E.L., Salazar, M.G., *et al.* (2009). The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 1253-1272.

- Gorin, A.M., Du, Y.S., Liu, F.Y., Zhang, T.H., Ng, H.L., Hofmann, C., Cumberland, W.G., Sun, R., and Yang, O.O. (2017). HIV-1 epitopes presented by MHC class I types associated with superior immune containment of viremia have highly constrained fitness landscapes. *Plos Pathogens* *13*.
- Gottardo, R., Bailer, R.T., Korber, B.T., Gnanakaran, S., Phillips, J., Shen, X., Tomaras, G.D., Turk, E., Imholte, G., Eckler, L., *et al.* (2013). Plasma IgG to Linear Epitopes in the V2 and V3 Regions of HIV-1 gp120 Correlate with a Reduced Risk of Infection in the RV144 Vaccine Efficacy Trial. *PLoS ONE* *8*, e75665.
- Gottlieb, G.S., Raugi, D.N., and Smith, R.A. (2018). 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *The Lancet HIV* *5*, e390-e399.
- Goulder, P.J.R., Phillips, R.E., Colbert, R.A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M.A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., *et al.* (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nature Medicine* *3*, 212-217.
- Graham, B.S., Belshe, R.B., Clements, M.L., Dolin, R., Corey, L., Wright, P.F., Gorse, G.J., Midthun, K., Keefer, M.C., Roberts, N.J., *et al.* (1992). Vaccination of Vaccinia-Naive Adults with Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp160 Recombinant Vaccinia Virus in a Blinded, Controlled, Randomized Clinical Trial. *Journal of Infectious Diseases* *166*, 244-252.
- Graham, Barney S., Koup, Richard A., Roederer, M., Bailer, Robert T., Enama, Mary E., Moodie, Z., Martin, Julie E., McCluskey, Margaret M., Chakrabarti, Bimal K., Lamoreaux, L., *et al.* (2006). Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 DNA Candidate Vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* *194*, 1650-1660.
- Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumfheller, C., Siegal, F.P., and Steinman, R.M. (2004). HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 7669-7674.
- Gray, E.S., Moore, P.L., Choge, I.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., Shaw, G.M., *et al.* (2007). Neutralizing Antibody Responses in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. *Journal of Virology* *81*, 6187-6196.
- Gray, G.E., Allen, M., Moodie, Z., Churchyard, G., Bekker, L.-G., Nchabeleng, M., Mlisana, K., Metch, B., de Bruyn, G., Latka, M.H., *et al.* (2011). Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili Study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *The Lancet Infectious Diseases* *11*, 507-515.
- Gray, R.R., Tatem, A.J., Lamers, S., Hou, W., Laeyendecker, O., Serwadda, D., Sewankambo, N., Gray, R.H., Wawer, M., Quinn, T.C., *et al.* (2009). Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. *Aids* *23*, F9-F17.
- Graziani, G.M., and Angel, J.B. (2016). HIV-1 Immunogen: an overview of almost 30 years of clinical testing of a candidate therapeutic vaccine. *Expert Opinion on Biological Therapy* *16*, 953-966.
- Greenblatt, R.M., Lukehart, S.A., Plummer, F.A., Quinn, T.C., Critchlow, C.W., Ashley, R.L., D'Costa, L.J., Ndinya-Achola, J.O., Corey, L., Ronald, A.R., *et al.* (1988). Genital ulceration as a risk factor for human immunodeficiency virus infection. *Aids* *2*, 47-50.
- Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., and Dandekar, S. (2003). Severe CD4+ T-Cell Depletion in Gut Lymphoid Tissue during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Substantial Delay in Restoration following Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology* *77*, 11708-11717.
- Guihot, A., Tubiana, R., Breton, G., Marcelin, A.-G., Samri, A., Assoumou, L., Goncalves, E., Bricaire, F., Costagliola, D., Calvez, V., *et al.* (2010). Immune and virological benefits of 10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy. *Aids* *24*, 614-617.
- Gupta, R.K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L.E., Mok, H.P., Peppas, D., Salgado, M., Martinez-Picado, J., Nijhuis, M., Wensing, A.M.J., Lee, H., *et al.* (2019). HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* *568*, 244-248.
- Gutjahr, A., Tiraby, G., Perouzel, E., Verrier, B., and Paul, S. (2016). Triggering Intracellular Receptors for Vaccine Adjuvantation (vol 37, pg 573, 2016). *Trends in Immunology* *37*, 716-716.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M. (2000). AIDS - AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science* *287*, 607-614.
- Halliday, A., Turner, J.D., Guimaraes, A., Bates, P.A., and Taylor, M.J. (2016). The TLR2/6 ligand PAM2CSK4 is a Th2 polarizing adjuvant in *Leishmania major* and *Brugia malayi* murine vaccine models. *Parasite Vector* *9*.

- Hammer, S.M., Sobieszczyk, M.E., Janes, H., Karuna, S.T., Mulligan, M.J., Grove, D., Koblin, B.A., Buchbinder, S.P., Keefer, M.C., Tomaras, G.D., *et al.* (2013). Efficacy Trial of a DNA/rAd5 HIV-1 Preventive Vaccine. *New England Journal of Medicine* *369*, 2083-2092.
- Hansen, S.G., Ford, J.C., Lewis, M.S., Ventura, A.B., Hughes, C.M., Coyne-Johnson, L., Whizin, N., Oswald, K., Shoemaker, R., Swanson, T., *et al.* (2011). Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* *473*, 523-527.
- Hansen, S.G., Jr, M.P., Ventura, A.B., Hughes, C.M., Gilbride, R.M., Ford, J.C., Oswald, K., Shoemaker, R., Li, Y., Lewis, M.S., *et al.* (2013a). Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* *502*, 100-104.
- Hansen, S.G., Sacha, J.B., Hughes, C.M., Ford, J.C., Burwitz, B.J., Scholz, I., Gilbride, R.M., Lewis, M.S., Gilliam, A.N., Ventura, A.B., *et al.* (2013b). Cytomegalovirus Vectors Violate CD8+ T Cell Epitope Recognition Paradigms. *Science* *340*, 1237874-1237874.
- Hansen, S.G., Wu, H.L., Burwitz, B.J., Hughes, C.M., Hammond, K.B., Ventura, A.B., Reed, J.S., Gilbride, R.M., Ainslie, E., Morrow, D.W., *et al.* (2016). Broadly targeted CD8+ T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science* *351*, 714-720.
- Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F., and Pantaleo, G. (2004). Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* *103*, 966-972.
- Harndahl, M., Rasmussen, M., Roder, G., Pedersen, I.D., Sorensen, M., Nielsen, M., and Buus, S. (2012). Peptide-MHC class I stability is a better predictor than peptide affinity of CTL immunogenicity. *European Journal of Immunology* *42*, 1405-1416.
- Hattab, S., Guiguet, M., Carcelain, G., Fourati, S., Guihot, A., Autran, B., Caby, F., Marcelin, A.G., Costagliola, D., and Katlama, C. (2015). Soluble biomarkers of immune activation and inflammation in HIV infection: impact of 2 years of effective first-line combination antiretroviral therapy. *HIV Medicine* *16*, 553-562.
- Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., *et al.* (2012). Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *New England Journal of Medicine* *366*, 1275-1286.
- Haynes, B.F., Moody, M.A., Verkoczy, L., Kelsoe, G., and Alam, S.M. (2005). Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis. *Human antibodies* *14*, 59-67.
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine* *18*, 182-192.
- Hersperger, A.R., Pereyra, F., Nason, M., Demers, K., Sheth, P., Shin, L.Y., Kovacs, C.M., Rodriguez, B., Sieg, S.F., Teixeira-Johnson, L., *et al.* (2010). Perforin Expression Directly Ex Vivo by HIV-Specific CD8+ T-Cells Is a Correlate of HIV Elite Control. *PLoS Pathogens* *6*, e1000917.
- Herzig, E., Voronin, N., Kucherenko, N., and Hizi, A. (2015). A Novel Leu92 Mutant of HIV-1 Reverse Transcriptase with a Selective Deficiency in Strand Transfer Causes a Loss of Viral Replication. *Journal of Virology* *89*, 8119-8129.
- Hocini, H., Bonhabau, H., Lacabaratz, C., Lefebvre, C., Tisserand, P., Foucat, E., Lelièvre, J.-D., Lambotte, O., Saez-Cirion, A., Versmisse, P., *et al.* (2019). HIV Controllers Have Low Inflammation Associated with a Strong HIV-Specific Immune Response in Blood. *Journal of Virology* *93*.
- Hoeffel, G., Ripoche, A.-C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.-G., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., *et al.* (2007). Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* *27*, 481-492.
- Hoffenbach, A., Langlade-Demoyen, P., Dadaglio, G., Vilmer, E., Michel, F., Mayaud, C., Autran, B., and Plata, F. (1989). Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Immunol* *142*, 452-462.
- Hoffman, W., Lakkis, F.G., and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* *11*, 137-154.
- Holland, C.J., Dolton, G., Scurr, M., Ladell, K., Schauenburg, A.J., Miners, K., Madura, F., Sewell, A.K., Price, D.A., Cole, D.K., *et al.* (2015). Enhanced Detection of Antigen-Specific CD4(+) T Cells Using Altered Peptide Flanking Residue Peptide-MHC Class II Multimers. *J Immunol* *195*, 5827-5836.
- Hooper, E. (1999). *The River* (Allen Lane).

- Hsu, D.C., and O'Connell, R.J. (2017). Progress in HIV vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* *13*, 1018-1030.
- Hufert, F.T., van Lunzen, J., Janossy, G., Bertram, S., Schmitz, J., Haller, O., Racz, P., and von Laer, D. (1997). Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *Aids* *11*, 849-857.
- Hunt, P.W., Sinclair, E., Rodriguez, B., Shive, C., Clagett, B., Funderburg, N., Robinson, J., Huang, Y., Epling, L., Martin, J.N., *et al.* (2014). Gut Epithelial Barrier Dysfunction and Innate Immune Activation Predict Mortality in Treated HIV Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *210*, 1228-1238.
- Iglesias, M.C., Almeida, J.R., Fastenackels, S., van Bockel, D.J., Hashimoto, M., Venturi, V., Gostick, E., Urrutia, A., Wooldridge, L., Clement, M., *et al.* (2011). Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV. *Blood* *118*, 2138-2149.
- International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, Deeks, S.G., Autran, B., Berkhout, B., Benkirane, M., Cairns, S., Chomont, N., Chun, T.W., Churchill, M., Di Mascio, M., *et al.* (2012). Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nature Reviews Immunology* *12*, 607-614.
- Inwoley, A., Recordon-Pinson, P., Dupuis, M., Gaston, J., Genete, M., Minga, A., Letourneur, F., Rouet, F., Choppin, J., Fleury, H., *et al.* (2005). Cross-clade conservation of HIV type 1 nef immunodominant regions recognized by CD8(+) T cells of HIV type 1 CRF02\_AG-infected Ivorian (West Africa). *Aids Research and Human Retroviruses* *21*, 620-628.
- Iyer, S.S., Bibollet-Ruche, F., Sherrill-Mix, S., Learn, G.H., Plenderleith, L., Smith, A.G., Barbian, H.J., Russell, R.M., Gondim, M.V.P., Bahari, C.Y., *et al.* (2017). Resistance to type 1 interferons is a major determinant of HIV-1 transmission fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *114*, E590-E599.
- Janda, A., Bowen, A., Greenspan, N.S., and Casadevall, A. (2016). Ig Constant Region Effects on Variable Region Structure and Function. *Frontiers in Microbiology* *7*.
- Janes, H., Friedrich, D.P., Krambrink, A., Smith, R.J., Kallas, E.G., Horton, H., Casimiro, D.R., Carrington, M., Geraghty, D.E., Gilbert, P.B., *et al.* (2013). Vaccine-Induced Gag-Specific T Cells Are Associated With Reduced Viremia After HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *208*, 1231-1239.
- Janes, H.E., Cohen, K.W., Frahm, N., De Rosa, S.C., Sanchez, B., Hural, J., Magaret, C.A., Karuna, S., Bentley, C., Gottardo, R., *et al.* (2017). Higher T-Cell Responses Induced by DNA/rAd5 HIV-1 Preventive Vaccine Are Associated With Lower HIV-1 Infection Risk in an Efficacy Trial. *The Journal of Infectious Diseases* *215*, 1376-1385.
- Janeway (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *54*, 1-13.
- Jekle, A., Keppler, O.T., De Clercq, E., Schols, D., Weinstein, M., and Goldsmith, M.A. (2003). In Vivo Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 toward Increased Pathogenicity through CXCR4-Mediated Killing of Uninfected CD4 T Cells. *Journal of Virology* *77*, 5846-5854.
- Jennewein, M.F., and Alter, G. (2017). The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation. *Trends in Immunology* *38*, 358-372.
- Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., *et al.* (1999). Dramatic Rise in Plasma Viremia after CD8+T Cell Depletion in Simian Immunodeficiency Virus-infected Macaques. *The Journal of Experimental Medicine* *189*, 991-998.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* *12*, 557-569.
- Johnson, J.A., Barouch, D.H., and Baden, L.R. (2013). Nonreplicating vectors in HIV vaccines. *Current Opinion in HIV and AIDS* *8*, 412-420.
- Johnson, R.P., Trocha, A., Yang, L., Mazzara, G.P., Panicali, D.L., Buchanan, T.M., and Walker, B.D. (1991). Hiv-1 Gag-Specific Cytotoxic Lymphocytes-T Recognize Multiple Highly Conserved Epitopes - Fine Specificity of the Gag-Specific Response Defined by Using Unstimulated Peripheral-Blood Mononuclear-Cells and Cloned Effector-Cells. *J Immunol* *147*, 1512-1521.
- Johnson, S., Eller, M., Teigler, J.E., Maloveste, S.M., Schultz, B.T., Soghoian, D.Z., Lu, R., Oster, A.F., Chenine, A.-L., Alter, G., *et al.* (2015). Cooperativity of HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cells and CD8 T Cells in Control of HIV Viremia. *Journal of Virology* *89*, 7494-7505.

- Jones, R.B., Ndhlovu, L.C., Barbour, J.D., Sheth, P.M., Jha, A.R., Long, B.R., Wong, J.C., Satkunarajah, M., Schwenecker, M., Chapman, J.M., *et al.* (2008). Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine* *205*, 2763-2779.
- Joseph, S.B., Swanstrom, R., Kashuba, A.D.M., and Cohen, M.S. (2015). Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses. *Nature Reviews Microbiology* *13*, 414-425.
- Jost, S., and Altfield, M. (2013). Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. *Annual Review of Immunology* *31*, 163-194.
- Julg, B., Williams, K.L., Reddy, S., Bishop, K., Qi, Y., Carrington, M., Goulder, P.J., Ndung'u, T., and Walker, B.D. (2010). Enhanced Anti-HIV Functional Activity Associated with Gag-Specific CD8 T-Cell Responses. *Journal of Virology* *84*, 5540-5549.
- Juno, J.A., van Bockel, D., Kent, S.J., Kelleher, A.D., Zaunders, J.J., and Munier, C.M.L. (2017). Cytotoxic CD4 T Cells - Friend or Foe during Viral Infection? *Frontiers in Immunology* *8*.
- Junqueira, D.M., and Almeida, S.E.d.M. (2016). HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology* *495*, 173-184.
- Jurtz, V., Paul, S., Andreatta, M., Marcatili, P., Peters, B., and Nielsen, M. (2017). NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J Immunol* *199*, 3360-3368.
- Kahn, J.O., Steimer, K.S., Baenziger, J., Duliege, A.M., Feinberg, M., Elbeik, T., Chesney, M., Murcar, N., Chernoff, D., and Sinangil, F. (1995). Clinical, Immunologic, and Virologic Observations Related to Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Infection in a Volunteer in an HIV-1 Vaccine Clinical Trial. *Journal of Infectious Diseases* *171*, 1343-1347.
- Kalams, S.A., Goulder, P.J., Shea, A.K., Jones, N.G., Trocha, A.K., Ogg, G.S., and Walker, B.D. (1999). Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *Journal of Virology* *73*, 6721-6728.
- Kalish, M.L., Robbins, K.E., Pieniazek, D., Schaefer, A., Nzilambi, N., Quinn, T.C., St Louis, M.E., Youngpairaj, A.S., Phillips, J., Jaffe, H.W., *et al.* (2004). Recombinant viruses and early global HIV-1 epidemic. *Emerg Infect Dis* *10*, 1227-1234.
- Kanki, P., Alroy, J., and Essex, M. (1985). Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. *Science* *230*, 951-954.
- Kardani, K., Bolhassani, A., and Shahbazi, S. (2016). Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. *Vaccine* *34*, 413-423.
- Katz, M.E., Maizels, R.M., Wicker, L., Miller, A., and Sercarz, E.E. (1982). Immunological focusing by the mouse major histocompatibility complex: Mouse strains confronted with distantly related lysozymes confine their attention to very few epitopes. *European Journal of Immunology* *12*, 535-540.
- Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., Pereyra, F., Zaunders, J.J., Mackey, E.W., Miura, T., Palmer, S., Brockman, M., Rathod, A., Piechocka-Trocha, A., *et al.* (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature Immunology* *8*, 1246-1254.
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y.Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y.L., Wain, L.V., Liegeois, F., *et al.* (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* *313*, 523-526.
- Kessing, C.F., Nixon, C.C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., Ho, P.T., Honeycutt, J.B., Fallahi, M., Trautmann, L., *et al.* (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a "Block-and-Lock" Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Reports* *21*, 600-611.
- Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., *et al.* (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature Medicine* *13*, 46-53.
- Kinloch-de Loes, S., Hoen, B., Smith, Don E., Autran, B., Lampe, Fiona C., Phillips, Andrew N., Goh, L.E., Andersson, J., Tsoukas, C., Sonnerborg, A., *et al.* (2005). Impact of Therapeutic Immunization on HIV-1 Viremia after Discontinuation of Antiretroviral Therapy Initiated during Acute Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *192*, 607-617.
- Kirmaier, A., Wu, F., Newman, R.M., Hall, L.R., Morgan, J.S., O'Connor, S., Marx, P.A., Meythaler, M., Goldstein, S., Buckler-White, A., *et al.* (2010). TRIM5 Suppresses Cross-Species Transmission of a Primate Immunodeficiency Virus and Selects for Emergence of Resistant Variants in the New Species. *PLoS Biology* *8*, e1000462.

- Klein, J.S., and Bjorkman, P.J. (2010). Few and Far Between: How HIV May Be Evading Antibody Avidity. *PLoS Pathogens* 6, e1000908.
- Klenerman, P., Rowland-Jones, S., McAdam, S., Edwards, J., Daenke, S., Laloo, D., Köppe, B., Rosenberg, W., Boyd, D., Edwards, A., *et al.* (1994). Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* 369, 403-407.
- Klinguer, C., David, D., Kouach, M., Wieruszeski, J.M., Tartar, A., Marzin, D., Levy, J.P., and Gras-Masse, H. (2000). Characterization of a multi-lipopeptides mixture used as an HIV-1 vaccine candidate. *Vaccine* 18, 259-267.
- Kloverpris, H.N., Payne, R.P., Sacha, J.B., Rasaiyaah, J.T., Chen, F.B., Takiguchi, M., Yang, O.O., Towers, G.J., Goulder, P., and Prado, J.G. (2013). Early Antigen Presentation of Protective HIV-1 KF11Gag and KK10Gag Epitopes from Incoming Viral Particles Facilitates Rapid Recognition of Infected Cells by Specific CD8(+) T Cells. *Journal of Virology* 87, 2628-2638.
- Kluge, S.F., Sauter, D., and Kirchhoff, F. (2015). SnapShot: Antiviral Restriction Factors. *Cell* 163, 774-774.e771.
- Koblischke, M., Mackroth, M.S., Schwaiger, J., Fae, I., Fischer, G., Stiasny, K., Heinz, F.X., and Aberle, J.H. (2017). Protein structure shapes immunodominance in the CD4 T cell response to yellow fever vaccination. *Scientific Reports* 7.
- Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., and Detours, V. (2001). Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British Medical Bulletin* 58, 19-42.
- Kostense, S., Vandenberghe, K., Joling, J., Van Baarle, D., Nanlohy, N., Manting, E., and Miedema, F. (2002). Persistent numbers of tetramer(+) CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma(+) HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* 99, 2505-2511.
- Kotturi, M.F., Scott, I., Wolfe, T., Peters, B., Sidney, J., Cheroutre, H., von Herrath, M.G., Buchmeier, M.J., Grey, H., and Sette, A. (2008). Naive Precursor Frequencies and MHC Binding Rather Than the Degree of Epitope Diversity Shape CD8+ T Cell Immunodominance. *The Journal of Immunology* 181, 2124-2133.
- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y.Z., Andrews, C.A., Mcleod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D.D. (1994). Temporal Association of Cellular Immune-Responses with the Initial Control of Viremia in Primary Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Syndrome. *Journal of Virology* 68, 4650-4655.
- Kreiss, J.K., Koech, D., Plummer, F.A., Holmes, K.K., Lightfoote, M., Piot, P., Ronald, A.R., Ndinya-Achola, J.O., D'Costa, L.J., Roberts, P., *et al.* (1986). AIDS Virus Infection in Nairobi Prostitutes. *New England Journal of Medicine* 314, 414-418.
- Kulkarni, A., Kurle, S., Shete, A., Ghate, M., Godbole, S., Madhavi, V., Kent, S.J., Paranjape, R., and Thakar, M. (2017). Indian Long-term Non-Progressors Show Broad ADCC Responses with Preferential Recognition of V3 Region of Envelope and a Region from Tat Protein. *Frontiers in Immunology* 8.
- Kulkarni, V., Valentin, A., Rosati, M., Alicea, C., Singh, A.K., Jalah, R., Broderick, K.E., Sardesai, N.Y., Le Gall, S., Mothe, B., *et al.* (2014). Altered Response Hierarchy and Increased T-Cell Breadth upon HIV-1 Conserved Element DNA Vaccination in Macaques. *PLoS ONE* 9, e86254.
- Kulpa D. A., and N., C. (2015). HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *journal of virus eradication* 1, 59-66.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal* 420, 1-16.
- Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Charini, W.A., Nickerson, C.E., Lifton, M.A., Lord, C.I., Forman, M.A., and Letvin, N.L. (1999). Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* 162, 5127-5133.
- Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., *et al.* (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.
- Lacabaratz-Porret, C., Viard, J.P., Goujard, C., Levy, Y., Rodallec, A., Deveau, C., Venet, A., and Sinet, M. (2004). Presence of HIV-specific CD4(+) T-cell responses in HIV-infected subjects with sustained virologic control after highly active antiretroviral therapy. *J AIDS-J Acq Imm Def* 36, 594-599.
- Lacabaratz, C., Bauduin, C., Wiedemann, A., Lhomme, E., Fenwick, C., Foucat, E., Boilet, V., Rieux, V., Pantaleo, G., Lelièvre, J.D., *et al.* (2018). DNA-GTU/LIPO-5 Vaccine Followed by Supervised Treatment Interruption (STI) in a Therapeutic HIV Phase II Randomized Trial: VRI02 ANRS 149 LIGHT. In HIVR4P (Madrid).

- Ladell, K., Hashimoto, M., Iglesias, Maria C., Wilmann, Pascal G., McLaren, James E., Gras, S., Chikata, T., Kuse, N., Fastenackels, S., Gostick, E., *et al.* (2013). A Molecular Basis for the Control of Preimmune Escape Variants by HIV-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells. *Immunity* *38*, 425-436.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., *et al.* (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women. *Aids* *7*, 95-102.
- Lambotte, O., Pollara, J., Boufassa, F., Moog, C., Venet, A., Haynes, B.F., Delfraissy, J.-F., Saez-Cirion, A., and Ferrari, G. (2013). High Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Are Correlated with Strong CD8 T Cell Viral Suppressive Activity but Not with B57 Status in HIV-1 Elite Controllers. *PLoS ONE* *8*, e74855.
- Landry, S.J. (2008). Three-Dimensional Structure Determines the Pattern of CD4<sup>+</sup> T-Cell Epitope Dominance in Influenza Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology* *82*, 1238-1248.
- Langford, S.E., Ananworanich, J., and Cooper, D.A. (2007). Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Research and Therapy* *4*, 11.
- Launay, O., Durier, C., Desaint, C., Silbermann, B., Jackson, A., Pialoux, G., Bonnet, B., Poizot-Martin, I., Gonzalez-Canali, G., Cuzin, L., *et al.* (2007). Cellular Immune Responses Induced with Dose-Sparing Intradermal Administration of HIV Vaccine to HIV-Uninfected Volunteers in the ANRS VAC16 Trial. *PLoS ONE* *2*, e725.
- Launay, O., Surenaud, M., Desaint, C., Ben Hamouda, N., Pialoux, G., Bonnet, B., Poizot-Martin, I., Gonzales, G., Cuzin, L., Bourgault-Villada, I., *et al.* (2013). Long-term CD4(+) and CD8(+) T-cell responses induced in HIV-uninfected volunteers following intradermal or intramuscular administration of an HIV-lipopeptide vaccine (ANRS VAC16). *Vaccine* *31*, 4406-4415.
- Laverdiere, M., Tremblay, J., Lavalley, R., Bonny, Y., Lacombe, M., Boileau, J., Lachapelle, J., and Lamoureux, C. (1983). Aids in Haitian Immigrants and in a Caucasian Woman Closely Associated with Haitians. *Canadian Medical Association Journal* *129*, 1209-1212.
- Lazarski, C.A., Chaves, F.A., Jenks, S.A., Wu, S., Richards, K.A., Weaver, J.M., and Sant, A.J. (2005). The Kinetic Stability of MHC Class II:Peptide Complexes Is a Key Parameter that Dictates Immunodominance. *Immunity* *23*, 29-40.
- Le Gall, S., Stamegna, P., and Walker, B.D. (2007). Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *Journal of Clinical Investigation* *117*, 3563-3575.
- Leblanc, R.P., Simard, M., Flegel, K.M., and Gilmore, N.J. (1983). Opportunistic Infections and Acquired Cellular Immune-Deficiency among Haitian Immigrants in Montreal. *Canadian Medical Association Journal* *129*, 1205-1209.
- Lee, B., Sharron, M., Montaner, L.J., Weissman, D., and Doms, R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 5215-5220.
- Legarth, R.A., Ahlström, M.G., Kronborg, G., Larsen, C.S., Pedersen, C., Pedersen, G., Mohey, R., Gerstoft, J., and Obel, N. (2016). Long-Term Mortality in HIV-Infected Individuals 50 Years or Older. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* *71*, 213-218.
- Leitman, E.M., Willberg, C.B., Tsai, M.-H., Chen, H., Buus, S., Chen, F., Riddell, L., Haas, D., Fellay, J., Goedert, J.J., *et al.* (2017). HLA-B\*14:02-Restricted Env-Specific CD8<sup>+</sup> T-Cell Activity Has Highly Potent Antiviral Efficacy Associated with Immune Control of HIV Infection. *Journal of Virology* *91*.
- Lelièvre, J.-D. (2019). Preexposure Prophylaxis for Mitigating Risk of HIV Transmission During HIV Cure-Related Clinical Trials With a Treatment Interruption. *The Journal of Infectious Diseases* *220*, S16-S18.
- Lelievre, J.D., and Levy, Y. (2016). HIV-1 prophylactic vaccines: state of the art. *Journal of Virus Eradication* *2*, 5-11.
- Lelièvre, J.D., Mammano, F., Arnoult, D., Petit, F., Grodet, A., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2004). A novel mechanism for HIV1-mediated bystander CD4<sup>+</sup> T-cell death: neighboring dying cells drive the capacity of HIV1 to kill noncycling primary CD4<sup>+</sup> T cells. *Cell Death & Differentiation* *11*, 1017-1027.
- Létourneau, S., Im, E.-J., Mashishi, T., Brereton, C., Bridgeman, A., Yang, H., Dorrell, L., Dong, T., Korber, B., McMichael, A.J., *et al.* (2007). Design and Pre-Clinical Evaluation of a Universal HIV-1 Vaccine. *PLoS ONE* *2*, e984.
- Levine, A.M., Groshen, S., Allen, J., Munson, K.M., Carlo, T.J., Daigle, A.E., Ferre, F., Jensen, F.C., Richieri, S.P., Trauger, R.J., *et al.* (1996). Initial studies on active immunization of HIV-infected subjects using a gp120-depleted HIV-1 immunogen: Long-term follow-up. *J Acq Immun Def Synd* *11*, 351-364.

- Levy, J.A. (2003). The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends in Immunology* *24*, 628-632.
- Levy, Y., Durier, C., Lascaux, A.S., Meiffredy, V., Gahery-Segard, H., Goujard, C., Rouzioux, C., Resch, M., Guillet, J.G., Kazatchkine, M., *et al.* (2006). Sustained control of viremia following therapeutic immunization in chronically HIV-1-infected individuals. *Aids* *20*, 405-413.
- Levy, Y., Gahery-Segard, H., Durier, C., Lascaux, A.S., Goujard, C., Meiffredy, V., Rouzioux, C., El Habib, R., Beumont-Mauviel, M., Guillet, J.G., *et al.* (2005). Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *Aids* *19*, 279-286.
- Lévy, Y., Thiébaud, R., Montes, M., Lacabaratz, C., Sloan, L., King, B., Pérusat, S., Harrod, C., Cobb, A., Roberts, L.K., *et al.* (2014). Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. *European Journal of Immunology* *44*, 2802-2810.
- Lewis, M.J., Lee, P., Ng, H.L., and Yang, O.O. (2012). Immune Selection In Vitro Reveals Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Sequence Motifs Important for Its Immune Evasion Function In Vivo. *Journal of Virology* *86*, 7126-7135.
- Li, F., Finnefrock, A.C., Dubey, S.A., Korber, B.T.M., Szinger, J., Cole, S., McElrath, M.J., Shiver, J.W., Casimiro, D.R., Corey, L., *et al.* (2011). Mapping HIV-1 Vaccine Induced T-Cell Responses: Bias towards Less-Conserved Regions and Potential Impact on Vaccine Efficacy in the Step Study. *PLoS ONE* *6*, e20479.
- Li, S.S., Gilbert, P.B., Tomaras, G.D., Kijak, G., Ferrari, G., Thomas, R., Pyo, C.-W., Zolla-Pazner, S., Montefiori, D., Liao, H.-X., *et al.* (2014). FCGR2C polymorphisms associate with HIV-1 vaccine protection in RV144 trial. *Journal of Clinical Investigation* *124*, 3879-3890.
- Liard, C., Munier, S., Arias, M., Joulin-Giet, A., Bonduelle, O., Duffy, D., Shattock, R.J., Verrier, B., and Combadiere, B. (2011). Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. *Vaccine* *29*, 6379-6391.
- Lichterfeld, M., Kaufmann, D.E., Yu, X.G., Mui, S.K., Addo, M.M., Johnston, M.N., Cohen, D., Robbins, G.K., Pae, E., Alter, G., *et al.* (2004). Loss of HIV-1-specific CD8+ T Cell Proliferation after Acute HIV-1 Infection and Restoration by Vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* *200*, 701-712.
- Lill, N.L., Tevethia, M.J., Hendrickson, W.G., and Tevethia, S.S. (1992). Cytotoxic Lymphocytes-T (CTL) against a Transforming Gene-Product Select for Transformed-Cells with Point Mutations within Sequences Encoding CTL Recognition Epitopes. *Journal of Experimental Medicine* *176*, 449-457.
- Lin, L., Finak, G., Ushey, K., Seshadri, C., Hawn, T.R., Frahm, N., Scriba, T.J., Mahomed, H., Hanekom, W., Bart, P.-A., *et al.* (2015). COMPASS identifies T-cell subsets correlated with clinical outcomes. *Nature Biotechnology* *33*, 610-616.
- Lissina, A., Fastenackels, S., Inglesias, M.C., Ladell, K., McLaren, J.E., Briceño, O., Gostick, E., Papagno, L., Autran, B., Sauce, D., *et al.* (2014). The link between CD8+ T-cell antigen-sensitivity and HIV-suppressive capacity depends on HLA restriction, target epitope and viral isolate. *Aids* *28*, 477-486.
- Little, S.J., McLean, A.R., Spina, C.A., Richman, D.D., and Havlir, D.V. (1999). Viral Dynamics of Acute HIV-1 Infection. *The Journal of Experimental Medicine* *190*, 841-850.
- Liu, R., Wang, J.B., Yang, Y., Khan, I., Dong, Y., and Zhu, N.S. (2016). A novel rabies virus lipopeptide provides a better protection by improving the magnitude of DCs activation and T cell responses. *Virus Res* *221*, 66-73.
- Liu, Y., McNevin, J., Cao, J., Zhao, H., Genowati, I., Wong, K., McLaughlin, S., McSweyn, M.D., Diem, K., Stevens, C.E., *et al.* (2006). Selection on the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteome following Primary Infection. *Journal of Virology* *80*, 9519-9529.
- Locatelli, S., and Peeters, M. (2012). Cross-species transmission of simian retroviruses. *Aids* *26*, 659-673.
- Loisel-Meyer, S., Swainson, L., Craveiro, M., Oburoglu, L., Mongellaz, C., Costa, C., Martinez, M., Cosset, F.L., Battini, J.L., Herzenberg, L.A., *et al.* (2012). Glut1-mediated glucose transport regulates HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 2549-2554.
- Lopez, E., Shattock, R.J., Kent, S.J., and Chung, A.W. (2018). The Multifaceted Nature of Immunoglobulin A and Its Complex Role in HIV. *AIDS Research and Human Retroviruses* *34*, 727-738.
- Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukoyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H.P., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., Whisstock, J.C., *et al.* (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* *121*, 2659-2668.

- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.Y., Archer, J., Pond, S.L.K., Chung, Y.S., Penugonda, S., Chipman, J.G., Fletcher, C.V., *et al.* (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* **530**, 51-+.
- Lu, L.L., Suscovich, T.J., Fortune, S.M., and Alter, G. (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology* **18**, 46-61.
- Luciani, F., Sanders, M.T., Oveissi, S., Pang, K.C., and Chen, W. (2013). Increasing Viral Dose Causes a Reversal in CD8+ T Cell Immunodominance during Primary Influenza Infection due to Differences in Antigen Presentation, T Cell Avidity, and Precursor Numbers. *The Journal of Immunology* **190**, 36-47.
- Lukashov, V.V., and Goudsmit, J. (1997). Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 subtype-specific V3 domain is confined to a sequence space with a fixed distance to the subtype consensus. *Journal of Virology* **71**, 6332-6338.
- Luzuriaga, K., Gay, H., Ziemniak, C., Sanborn, K.B., Somasundaran, M., Rainwater-Lovett, K., Mellors, J.W., Rosenbloom, D., and Persaud, D. (2015). Viremic Relapse after HIV-1 Remission in a Perinatally Infected Child. *New England Journal of Medicine* **372**, 786-788.
- Maartens, G., Celum, C., and Lewin, S.R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* **384**, 258-271.
- MacGregor, R.R., Boyer, J.D., Ugen, K.E., Lacy, K.E., Gluckman, S.J., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M.A., Baine, Y., Higgins, T.J., Ciccarelli, R.B., *et al.* (1998). First Human Trial of a DNA-Based Vaccine for Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Safety and Host Response. *Journal of Infectious Diseases* **178**, 92-100.
- Madhavi, V., Wines, B.D., Amin, J., Emery, S., Lopez, E., Kelleher, A., Center, R.J., Hogarth, P.M., Chung, A.W., Kent, S.J., *et al.* (2017). HIV-1 Env- and Vpu-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Associated with Elite Control of HIV. *Journal of Virology* **91**.
- Mann, J.M., Davachi, F., Quinn, T.C., Bosenge, N., Piot, P., Asila, P.K., Curran, J.W., Francis, H., Baudoux, P., Nzilambi, N., *et al.* (1986). Risk-Factors for Human-Immunodeficiency-Virus Seropositivity among Children 1-24 Months Old in Kinshasa, Zaire. *Lancet* **2**, 654-657.
- Marcus, J.L., Hurley, L.B., Nguyen, D.P., Silverberg, M.J., and Volk, J.E. (2017). Redefining Human Immunodeficiency Virus (HIV) Preexposure Prophylaxis Failures. *Clinical Infectious Diseases* **65**, 1768-1769.
- Marrazzo, J.M., Ramjee, G., Richardson, B.A., Gomez, K., Mgodhi, N., Nair, G., Palanee, T., Nakabiito, C., van der Straten, A., Noguchi, L., *et al.* (2015). Tenofvir-Based Preexposure Prophylaxis for HIV Infection among African Women. *New England Journal of Medicine* **372**, 509-518.
- Martinez-Picado, J., Prado, J.G., Fry, E.E., Pfafferott, K., Leslie, A., Chetty, S., Thobakgale, C., Honeyborne, I., Crawford, H., Matthews, P., *et al.* (2006). Fitness Cost of Escape Mutations in p24 Gag in Association with Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* **80**, 3617-3623.
- Martinon, F., Grasmassé, H., Boutillon, C., Chirat, F., Deprez, B., Guillet, J.G., Gomard, E., Tartar, A., and Levy, J.P. (1992). Immunization of Mice with Lipopeptides Bypasses the Prerequisite for Adjuvant - Immune-Response of Balb/C Mice to Human-Immunodeficiency-Virus Envelope Glycoprotein. *J Immunol* **149**, 3416-3422.
- Marx, P.A., Apetrei, C., and Drucker, E. (2004). AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *Journal of Medical Primatology* **33**, 220-226.
- Marx, P.A., Hamilton, W., Weiss, R.A., Wain-Hobson, S., Alcabas, P.G., and Drucker, E. (2001). Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **356**, 911-920.
- Mascola, J.R., and Haynes, B.F. (2013). HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunological Reviews* **254**, 225-244.
- Mascola, J.R., Snyder, S.W., Weislow, O.S., Belay, S.M., Belshe, R.B., Schwartz, D.H., Clements, M.L., Dolin, R., Graham, B.S., Gorse, G.J., *et al.* (1996). Immunization with Envelope Subunit Vaccine Products Elicits Neutralizing Antibodies against Laboratory-Adapted but Not Primary Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Infectious Diseases* **173**, 340-348.
- Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Vande Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., *et al.* (1981). An Outbreak of Community-Acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *New England Journal of Medicine* **305**, 1431-1438.

- Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H.C., and Martin, M.A. (1998). Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *Journal of Virology* *72*, 164-169.
- Matthews, P.C., Leslie, A.J., Katzourakis, A., Crawford, H., Payne, R., Prendergast, A., Power, K., Kelleher, A.D., Klenerman, P., Carlson, J., *et al.* (2009). HLA Footprints on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Are Associated with Interclade Polymorphisms and Intraclade Phylogenetic Clustering. *Journal of Virology* *83*, 4605-4615.
- McCormack, S., Dunn, D.T., Desai, M., Dolling, D.I., Gafos, M., Gilson, R., Sullivan, A.K., Clarke, A., Reeves, I., Schembri, G., *et al.* (2016). Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *The Lancet* *387*, 53-60.
- McElrath, M.J., De Rosa, S.C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O.D., Carter, D.K., Hural, J., Akondy, R., *et al.* (2008). HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *The Lancet* *372*, 1894-1905.
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* *10*, 11-23.
- Medlock, J., Pandey, A., Parpia, A.S., Tang, A., Skrip, L.A., and Galvani, A.P. (2017). Effectiveness of UNAIDS targets and HIV vaccination across 127 countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *114*, 4017-4022.
- Mehandru, S., Poles, M.A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., and Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Experimental Medicine* *200*, 761-770.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* *272*, 1167-1170.
- Mendoza, P., Gruell, H., Nogueira, L., Pai, J.A., Butler, A.L., Millard, K., Lehmann, C., Suarez, I., Oliveira, T.Y., Lorenzi, J.C.C., *et al.* (2018). Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature* *561*, 479+.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology* *31*, 563-604.
- Merz, B. (1987). Hiv Vaccine Approved for Clinical-Trials. *Jama-J Am Med Assoc* *258*, 1433-1434.
- Migueles, S.A., Laborico, A.C., Shupert, W.L., Sabbaghian, M.S., Rabin, R., Hallahan, C.W., Baarle, D.V., 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.
- Migueles, S.A., Osborne, C.M., Royce, C., Compton, A.A., Joshi, R.P., Weeks, K.A., Rood, J.E., Berkley, A.M., Sacha, J.B., Cogliano-Shutta, N.A., *et al.* (2008). Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control. *Immunity* *29*, 1009-1021.
- Mirano-Bascos, D., Tary-Lehmann, M., and Landry, S.J. (2008). Antigen structure influences helper T-cell epitope dominance in the human immune response to HIV envelope glycoprotein gp120. *European Journal of Immunology* *38*, 1231-1237.
- Miura, T., Brockman, M.A., Brumme, Z.L., Brumme, C.J., Pereyra, F., Trocha, A., Block, B.L., Schneidewind, A., Allen, T.M., Heckerman, D., *et al.* (2009). HLA-Associated Alterations in Replication Capacity of Chimeric NL4-3 Viruses Carrying gag-protease from Elite Controllers of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* *83*, 140-149.
- Miura, T., Brumme, Z.L., Brockman, M.A., Rosato, P., Sela, J., Brumme, C.J., Pereyra, F., Kaufmann, D.E., Trocha, A., Block, B.L., *et al.* (2010). Impaired Replication Capacity of Acute/Early Viruses in Persons Who Become HIV Controllers. *Journal of Virology* *84*, 7581-7591.
- Miyazawa, M., Lopalco, L., Mazzotta, F., Caputo, S.L., Veas, F., and Clerici, M. (2009). The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. *Aids* *23*, 161-175.
- Mo, A.X.Y., van Lelyveld, S.F.L., Craiu, A., and Rock, K.L. (2000). Sequences That Flank Subdominant and Cryptic Epitopes Influence the Proteolytic Generation of MHC Class I-Presented Peptides. *The Journal of Immunology* *164*, 4003-4010.
- Moir, S., Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* *6*, 223-248.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology* *9*, 235-245.

- Molina, J.-M., Capitant, C., Spire, B., Pialoux, G., Cotte, L., Charreau, I., Tremblay, C., Le Gall, J.-M., Cua, E., Pasquet, A., *et al.* (2015). On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine* *373*, 2237-2246.
- Montaner, L.J., Doyle, A.G., Collin, M., Herbein, G., Illei, P., James, W., Minty, A., Caput, D., Ferrara, P., and Gordon, S. (1993). Interleukin-13 Inhibits Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Production in Primary Blood-Derived Human Macrophages in-Vitro. *Journal of Experimental Medicine* *178*, 743-747.
- Moodie, Z., Metch, B., Bekker, L.-G., Churchyard, G., Nchabeleng, M., Mlisana, K., Laher, F., Roux, S., Mngadi, K., Innes, C., *et al.* (2015). Continued Follow-Up of Phambili Phase 2b Randomized HIV-1 Vaccine Trial Participants Supports Increased HIV-1 Acquisition among Vaccinated Men. *Plos One* *10*, e0137666.
- Moore, J.P., Kitchen, S.G., Pugach, P., and Zack, J.A. (2004). The CCR5 and CXCR4 Coreceptors—Central to Understanding the Transmission and Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* *20*, 111-126.
- Mori, H., Kojima, Y., Kawahata, T., Matsuura, M., Uno, K., Konishi, M., and Komano, J. (2015). A cluster of rapid disease progressors upon primary HIV-1 infection shared a novel variant with mutations in the p6gag/pol and pol/vif genes. *Aids* *29*, 1717-1719.
- Mortara, L., Letourneur, F., Gras-Masse, H., Venet, A., Guillet, J.G., and Bourgault-Villada, I. (1998). Selection of virus variants and emergence of virus escape mutants after immunization with an epitope vaccine. *Journal of Virology* *72*, 1403-1410.
- Moss, P.A., Rowland-Jones, S.L., Frodsham, P.M., McAdam, S., Giangrande, P., McMichael, A.J., and Bell, J.I. (1995). Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 5773-5777.
- Mothe, B., Llano, A., Ibarrondo, J., Daniels, M., Miranda, C., Zamarreño, J., Bach, V., Zuniga, R., Pérez-Álvarez, S., Berger, C.T., *et al.* (2011). Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses. *Journal of Translational Medicine* *9*, 208.
- Mothe, B., Llano, A., Ibarrondo, J., Zamarreño, J., Schiaulini, M., Miranda, C., Ruiz-Riol, M., Berger, C.T., Herrero, M.J., Palou, E., *et al.* (2012). CTL Responses of High Functional Avidity and Broad Variant Cross-Reactivity Are Associated with HIV Control. *PLoS ONE* *7*, e29717.
- Mouquet, H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends in Immunology* *35*, 549-561.
- Murakoshi, H., Akahoshi, T., Koyanagi, M., Chikata, T., Naruto, T., Maruyama, R., Tamura, Y., Ishizuka, N., Gatanaga, H., Oka, S., *et al.* (2015). Clinical Control of HIV-1 by Cytotoxic T Cells Specific for Multiple Conserved Epitopes. *Journal of Virology* *89*, 5330-5339.
- Murakoshi, H., Zou, C.C., Kuse, N., Akahoshi, T., Chikata, T., Gatanaga, H., Oka, S., Hanke, T., and Takiguchi, M. (2018). CD8(+) T cells specific for conserved, cross-reactive Gag epitopes with strong ability to suppress HIV-1 replication. *Retrovirology* *15*.
- Muraro, E., Merlo, A., Martorelli, D., Cangemi, M., Dalla Santa, S., Dolcetti, R., and Rosato, A. (2017). Fighting Viral Infections and Virus-Driven Tumors with Cytotoxic CD4+ T Cells. *Frontiers in Immunology* *8*.
- Murphey-Corb, M., Martin, L., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R., Miller, M., West, M., Ohkawa, S., Baskin, G., Zhang, J., Putney, S., *et al.* (1989). A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* *246*, 1293-1297.
- Murray, S.E., Nesterenko, P.A., Vanarsdall, A.L., Munks, M.W., Smart, S.M., Veziroglu, E.M., Sagario, L.C., Lee, R., Claas, F.H.J., Doxiadis, I.I.N., *et al.* (2017). Fibroblast-adapted human CMV vaccines elicit predominantly conventional CD8 T cell responses in humans. *The Journal of Experimental Medicine* *214*, 1889-1899.
- Musey, Luwy K., Krieger, John N., Hughes, James P., Schacker, Timothy W., Corey, L., and McElrath, M.J. (1999). Early and Persistent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T Helper Dysfunction in Blood and Lymph Nodes following Acute HIV-1 Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *180*, 278-284.
- Mutua, G., Farah, B., Langat, R., Indangasi, J., Ogola, S., Onsembe, B., Kopycinski, J.T., Hayes, P., Borthwick, N.J., Ashraf, A., *et al.* (2016). Broad HIV-1 inhibition in vitro by vaccine-elicited CD8+ T cells in African adults. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* *3*, 16061.
- Myers, G. (1994). HIV: Between Past and Future. *AIDS Research and Human Retroviruses* *10*, 1317-1324.

- Myers, G., and Lenroot, R. (1992). HIV Glycosylation: What Does It Portend? *AIDS Research and Human Retroviruses* *8*, 1459-1460.
- Mylvaganam, G.H., Silvestri, G., and Amara, R.R. (2015). HIV therapeutic vaccines: moving towards a functional cure. *Current Opinion in Immunology* *35*, 1-8.
- Mzingwane, M.L., and Tiemessen, C.T. (2017). Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. *Reviews in Medical Virology* *27*, e1924.
- Nachega, J.B., Marconi, V.C., van Zyl, G.U., Gardner, E.M., Preiser, W., Hong, S.Y., Mills, E.J., and Gross, R. (2011). HIV treatment adherence, drug resistance, virologic failure: evolving concepts. *infectious disorders drug targets* *11*, 167-174.
- Ndhlovu, Z.M., Chibnik, L.B., Proudfoot, J., Vine, S., McMullen, A., Cesa, K., Porichis, F., Jones, R.B., Alvino, D.M., Hart, M.G., *et al.* (2013). High-dimensional immunomonitoring models of HIV-1-specific CD8 T-cell responses accurately identify subjects achieving spontaneous viral control. *Blood* *121*, 801-811.
- Ndhlovu, Zaza M., Kanya, P., Mewalal, N., Kløverpris, Henrik N., Nkosi, T., Pretorius, K., Laher, F., Ogunshola, F., Chopera, D., Shekhar, K., *et al.* (2015). Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point. *Immunity* *43*, 591-604.
- Ndhlovu, Z.M., Kazer, S.W., Nkosi, T., Ogunshola, F., Muema, D.M., Anmole, G., Swann, S.A., Moodley, A., Dong, K., Reddy, T., *et al.* (2019). Augmentation of HIV-specific T cell function by immediate treatment of hyperacute HIV-1 infection. *Science Translational Medicine* *11*, eaau0528.
- Neisig, A., Roelse, J., Sijts, A.J.A.M., Ossendorp, F., Feltkamp, M.C.W., Kast, W.M., Melief, C.J.M., and Neefjes, J.J. (1995). Major Differences in Transporter Associated with Antigen Presentation (Tap)-Dependent Translocation of Mhc Class I-Presentable Peptides and the Effect of Flanking Sequences. *J Immunol* *154*, 1273-1279.
- Nel, A., van Niekerk, N., Kapiga, S., Bekker, L.-G., Gama, C., Gill, K., Kamali, A., Kotze, P., Louw, C., Mabude, Z., *et al.* (2016). Safety and Efficacy of a Dapivirine Vaginal Ring for HIV Prevention in Women. *New England Journal of Medicine* *375*, 2133-2143.
- Nemes, E., Bertoncelli, L., Lugli, E., Pinti, M., Nasi, M., Manzini, L., Manzini, S., Prati, F., Borghi, V., Cossarizza, A., *et al.* (2010). Cytotoxic granule release dominates gag-specific CD4+ T-cell response in different phases of HIV infection. *Aids* *24*, 947-957.
- Nyanhete, T.E., Frisbee, A.L., Bradley, T., Faison, W.J., Robins, E., Payne, T., Freel, S.A., Sawant, S., Weinhold, K.J., Wiehe, K., *et al.* (2019). HLA class II-Restricted CD8+T cells in HIV-1 Virus Controllers. *Scientific Reports* *9*.
- Nzilambi, N., De Cock, K.M., Forthal, D.N., Francis, H., Ryder, R.W., Malebe, I., Getchell, J., Laga, M., Piot, P., and McCormick, J.B. (1988). The Prevalence of Infection with Human Immunodeficiency Virus over a 10-Year Period in Rural Zaire. *New England Journal of Medicine* *318*, 276-279.
- Okulicz, J.F. (2012). Elite Controllers and Long-term Nonprogressors: Models for HIV Vaccine Development? *Journal of AIDS & Clinical Research* *03*.
- Oliva, A., Kinter, A.L., Vaccarezza, M., Rubbert, A., Catanzaro, A., Moir, S., Monaco, J., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., *et al.* (1998). Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *Journal of Clinical Investigation* *102*, 223-231.
- ONUSIDA (2018). Fact sheet. <https://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>
- Orange, J.S. (2013). Natural killer cell deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* *132*, 515-525.
- Osoba, A.O. (1981). Sexually-Transmitted Diseases in Tropical Africa - a Review of the Present Situation. *Brit J Vener Dis* *57*, 89-94.
- Ostrowski, M.A., Justement, S.J., Catanzaro, A., Hallahan, C.A., Ehler, L.A., Mizell, S.B., Kumar, P.N., Mican, J.A., Chun, T.W., and Fauci, A.S. (1998). Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol* *161*, 3195-3201.
- Palella, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J., and Holmberg, S.D. (1998). Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine* *338*, 853-860.

- Pan, X., Baldauf, H.-M., Keppler, O.T., and Fackler, O.T. (2013). Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes. *Cell Research* 23, 876-885.
- Pancré, V., Delhem, N., Yazdanpanah, Y., Delanoye, A., Delacre, M., Depil, S., Moralès, O., Mouton, Y., and Aurialt, C. (2007). Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine* 25, 5927-5937.
- Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *European Journal of Immunology* 19, 2237-2242.
- Pantaleo, G., Demarest, J.F., Schacker, T., Vaccarezza, M., Cohen, O.J., Daucher, M., Graziosi, C., Schnittman, S.S., Quinn, T.C., Shaw, G.M., *et al.* (1997). The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 254-258.
- Pantaleo, G., and Fauci, A.S. (1996). Immunopathogenesis of HIV Infection. *Annual Review of Microbiology* 50, 825-854.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Butini, L., Pizzo, P.A., Schnittman, S.M., Kotler, D.P., and Fauci, A.S. (1991). Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 9838-9842.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Cohen, O.J., Vaccarezza, M., Gantt, K., Murocacho, C., and Fauci, A.S. (1994). Role of Lymphoid Organs in the Pathogenesis of Human-Immunodeficiency-Virus (HIV) Infection. *Immunological Reviews* 140, 105-130.
- Pantaleo, G., and Levy, Y. (2016). Therapeutic vaccines and immunological intervention in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS* 11, 576-584.
- Paolini, R., Bernardini, G., Molfetta, R., and Santoni, A. (2015). NK cells and interferons. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26, 113-120.
- Papagno, L., Spina, C.A., Marchant, A., Salio, M., Rufer, N., Little, S., Dong, T., Chesney, G., Waters, A., Easterbrook, P., *et al.* (2004). Immune Activation and CD8+ T-Cell Differentiation towards Senescence in HIV-1 Infection. *PLoS Biology* 2, e20.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264.
- Parks, C.L., Picker, L.J., and King, C.R. (2013). Development of replication-competent viral vectors for HIV vaccine delivery. *Current Opinion in HIV and AIDS* 8, 402-411.
- Pascal, L. (1991). What Happens When Science Goes Bad. The Corruption of Science and the Origin of AIDS: A Study in Spontaneous Generation (University of Wollongong Science and Technology Analysis Research Programme Working Paper No. 9).
- Patel, P., Borkowf, C.B., Brooks, J.T., Lasry, A., Lansky, A., and Mermin, J. (2014). Estimating per-act HIV transmission risk. *Aids* 28, 1509-1519.
- Paul, S., Weiskopf, D., Angelo, M.A., Sidney, J., Peters, B., and Sette, A. (2013). HLA Class I Alleles Are Associated with Peptide-Binding Repertoires of Different Size, Affinity, and Immunogenicity. *The Journal of Immunology* 191, 5831-5839.
- Paust, S., Blish, C.A., Reeves, R.K., and Pierson, T.C. (2017). Redefining Memory: Building the Case for Adaptive NK Cells. *Journal of Virology* 91.
- Peeters, M., Honoré, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R.W., and Delaporte, E. (1989). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *Aids* 3, 625-630.
- Pépin, J. (2011). *The origins of AIDS* (Cambridge University Press).
- Pépin, J. (2012). The expansion of HIV-1 in colonial Léopoldville, 1950s: driven by STDs or STD control? *Sexually Transmitted Infections* 88, 307-312.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., and Ho, D.D. (1996). HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. *Science* 271, 1582-1586.

- Pereyra, F., Heckerman, D., Carlson, J.M., Kadie, C., Soghoian, D.Z., Karel, D., Goldenthal, A., Davis, O.B., DeZiel, C.E., Lin, T.H., *et al.* (2014). HIV Control Is Mediated in Part by CD8(+) T-Cell Targeting of Specific Epitopes. *Journal of Virology* *88*, 12937-12948.
- Pereyra, F.P., Jia, X.M., McLaren, P.J., Telenti, A., de Bakker, P.I.W., Walker, B.D., Ripke, S., Brumme, C.J., Pulit, S.L., Carrington, M., *et al.* (2010). The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science* *330*, 1551-1557.
- Perez, C.L., Larsen, M.V., Gustafsson, R., Norstrom, M.M., Atlas, A., Nixon, D.F., Nielsen, M., Lund, O., and Karlsson, A.C. (2008). Broadly immunogenic HLA class I supertype-restricted elite CTL epitopes recognized in a diverse population infected with different HIV-1 subtypes. *J Immunol* *180*, 5092-5100.
- Perez, C.L., Milush, J.M., Buggert, M., Eriksson, E.M., Larsen, M.V., Liegler, T., Hartogensis, W., Bacchetti, P., Lund, O., Hecht, F.M., *et al.* (2013). Targeting of Conserved Gag-Epitopes in Early HIV Infection Is Associated with Lower Plasma Viral Load and Slower CD4(+) T Cell Depletion. *Aids Research and Human Retroviruses* *29*, 602-612.
- Perreau, M., Banga, R., and Pantaleo, G. (2017). Targeted Immune Interventions for an HIV-1 Cure. *Trends in Molecular Medicine* *23*, 945-961.
- Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *The Journal of Experimental Medicine* *210*, 143-156.
- Perreau, M., Welles, H.C., Harari, A., Calandra, T., Roger, T., and Pantaleo, G. (2012). Modulation of human memory T-cell function by different antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology* *42*, 799-802.
- Peters, B.S. (2002). The basis for HIV immunotherapeutic vaccines. *Vaccine* *20*, 688-705.
- Pialoux, G., Gahery-Segard, H., Sermet, S., Poncelet, H., Fournier, S., Gerard, L., Tartar, A., Gras-Masse, H., Levy, J.P., Guillet, J.G., *et al.* (2001). Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers. *Aids* *15*, 1239-1249.
- Pialoux, G., Hocini, H., Perusat, S., Silberman, B., Salmon-Ceron, D., Slama, L., Journot, V., Mathieu, E., Gaillard, C., Petitprez, K., *et al.* (2008a). Phase I study of a candidate vaccine based on recombinant HIV-1 gp160 (MN/LAI) administered by the mucosal route to HIV-seronegative volunteers: The ANRS VAC14 study. *Vaccine* *26*, 2657-2666.
- Pialoux, G., Quercia, R.P., Gahery, H., Daniel, N., Slama, L., Girard, P.M., Bonnard, P., Rozenbaum, W., Schneider, V., Salmon, D., *et al.* (2008b). Immunological responses and long-term treatment interruption after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) lipopeptide immunization of HIV-1-infected patients: the LIPTHERA study. *Clinical and Vaccine Immunology* *15*, 562-568.
- Picard, O., Giral, P., Defer, M.C., Fouchard, M., Morel, M., Meyohas, M.C., Imbert, J.C., Lebas, J., Frottier, J., Salaun, J.J., *et al.* (1990). AIDS vaccine therapy: phase I trial. *The Lancet* *336*, 179.
- Piot, P., Plummer, F., Mhalu, F., Lamboray, J., Chin, J., and Mann, J. (1988). AIDS: an international perspective. *Science* *239*, 573-579.
- Piot, P., Taelman, H., Bila Minlangu, K., Mbendi, N., Ndangi, K., Kalambayi, K., Bridts, C., Quinn, T., Feinsod, F., Wobin, O., *et al.* (1984). Acquired Immunodeficiency Syndrome in a Heterosexual Population in Zaire. *The Lancet* *324*, 65-69.
- Pitchenik, A.E. (1983). Opportunistic Infections and Kaposi's Sarcoma Among Haitians: Evidence of a New Acquired Immunodeficiency State. *Annals of Internal Medicine* *98*, 277.
- Pitcher, C.J., Quittner, C., Peterson, D.M., Connors, M., Koup, R.A., Maino, V.C., and Picker, L.J. (1999). HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nature Medicine* *5*, 518-525.
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F., Hu, D., Tappero, Jordan W., and Choopanya, K. (2006). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Efficacy Trial of a Bivalent Recombinant Glycoprotein 120 HIV-1 Vaccine among Injection Drug Users in Bangkok, Thailand. *The Journal of Infectious Diseases* *194*, 1661-1671.
- Planchais, C., Hocqueloux, L., Ibanez, C., Gallien, S., Copie, C., Surenaud, M., Kök, A., Lorin, V., Fusaro, M., Delfau-Larue, M.-H., *et al.* (2018). Early Antiretroviral Therapy Preserves Functional Follicular Helper T and HIV-Specific B Cells in the Gut Mucosa of HIV-1-Infected Individuals. *The Journal of Immunology* *200*, 3519-3529.

- Planes, R., BenMohamed, L., Leghmari, K., Delobel, P., Izopet, J., and Bahraoui, E. (2014). HIV-1 Tat Protein Induces PD-L1 (B7-H1) Expression on Dendritic Cells through Tumor Necrosis Factor Alpha- and Toll-Like Receptor 4-Mediated Mechanisms. *Journal of Virology* *88*, 6672-6689.
- Planque, S., Salas, M., Mitsuda, Y., Siencyzyk, M., Escobar, M.A., Mooney, J.P., Morris, M.-K., Nishiyama, Y., Ghosh, D., Kumar, A., *et al.* (2010). Neutralization of genetically diverse HIV-1 strains by IgA antibodies to the gp120-CD4-binding site from long-term survivors of HIV infection. *Aids* *24*, 875-884.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine* *15*, 871-872.
- Plotkin, S.A. (2010). Correlates of Protection Induced by Vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology* *17*, 1055-1065.
- Poles, M.A., Elliott, J., Taing, P., Anton, P.A., and Chen, I.S.Y. (2001). A Preponderance of CCR5+ CXCR4+ Mononuclear Cells Enhances Gastrointestinal Mucosal Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology* *75*, 8390-8399.
- Pontesilli, O., Carlesimo, M., Varani, A.R., Ferrara, R., D'Offizi, G., and Aiuti, F. (1994). In Vitro Lymphocyte Proliferative Response to HIV-1 p24 Is Associated with a Lack of CD4+ Cell Decline. *AIDS Research and Human Retroviruses* *10*, 113-114.
- Pontesilli, O., Carotenuto, P., Kerkhof-Garde, S.R., Roos, M.T.M., Keet, I.P.M., Coutinho, R.A., Goudsmit, J., and Miedema, F. (1999). Lymphoproliferative Response to HIV Type 1 p24 in Long-Term Survivors of HIV Type 1 Infection Is Predictive of Persistent AIDS-Free Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* *15*, 973-981.
- Pontesilli, O., Klein, M.R., Kerkhof-Garde, S.R., Pakker, N.G., de Wolf, F., Schuitemaker, H., and Miedema, F. (1998). Longitudinal Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses: A Predominant Gag-Specific Response Is Associated with Nonprogressive Infection. *The Journal of Infectious Diseases* *178*, 1008-1018.
- Potter, S.J., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Perez-Patrigéon, S., Vingert, B., Sinet, M., Colle, J.H., Urrutia, A., Scott-Algara, D., Boufassa, F., *et al.* (2007). Preserved Central Memory and Activated Effector Memory CD4+ T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Controllers: an ANRS EP36 Study. *Journal of Virology* *81*, 13904-13915.
- Poudrier, J., Thibodeau, V., and Roger, M. (2012). Natural Immunity to HIV: A Delicate Balance between Strength and Control. *Clinical and Developmental Immunology* *2012*, 1-10.
- Preston, B., Poiesz, B., and Loeb, L. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* *242*, 1168-1171.
- Price, D.A., Goulder, P.J.R., Klenerman, P., Sewell, A.K., Easterbrook, P.J., Troop, M., Bangham, C.R.M., and Phillips, R.E. (1997). Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *94*, 1890-1895.
- Price, D.A., Sewell, A.K., Dong, T., Tan, R., Goulder, P.J.R., Rowland-Jones, S.L., and Phillips, R.E. (1998). Antigen-specific release of  $\beta$ -chemokines by anti-HIV-1 cytotoxic T lymphocytes. *Current Biology* *8*, 355-358.
- Probst, H.C., Tschannen, K., Gallimore, A., Martinic, M., Basler, M., Dumrese, T., Jones, E., and van den Broek, M.F. (2003). Immunodominance of an Antiviral Cytotoxic T Cell Response Is Shaped by the Kinetics of Viral Protein Expression. *The Journal of Immunology* *171*, 5415-5422.
- Ramirez, L.A., Arango, T., and Boyer, J. (2013). Therapeutic and prophylactic DNA vaccines for HIV-1. *Expert Opinion on Biological Therapy* *13*, 563-573.
- Ramshaw IA, R.A. (2000). The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology Today*.
- Ranasinghe, S., Cutler, S., Davis, I., Lu, R., Soghoian, D.Z., Qi, Y., Sidney, J., Kranias, G., Flanders, M.D., Lindqvist, M., *et al.* (2013). Association of HLA-DRB1-restricted CD4+ T cell responses with HIV immune control. *Nature Medicine* *19*, 930-933.
- Ranasinghe, S., Flanders, M., Cutler, S., Soghoian, D.Z., Ghebremichael, M., Davis, I., Lindqvist, M., Pereyra, F., Walker, B.D., Heckerman, D., *et al.* (2012). HIV-Specific CD4 T Cell Responses to Different Viral Proteins Have Discordant Associations with Viral Load and Clinical Outcome. *Journal of Virology* *86*, 277-283.
- Ranasinghe, S., Lamothe, Pedro A., Soghoian, Damien Z., Kazer, Samuel W., Cole, Michael B., Shalek, Alex K., Yosef, N., Jones, R.B., Donaghey, F., Nwonu, C., *et al.* (2016). Antiviral CD8 + T Cells Restricted by Human Leukocyte Antigen Class II Exist during Natural HIV Infection and Exhibit Clonal Expansion. *Immunity* *45*, 917-930.
- Rao, X., Hoof, I., Fontaine Costa, A.I.C.A., van Baarle, D., and Keşmir, C. (2011). HLA class I allele promiscuity revisited. *Immunogenetics* *63*, 691-701.

- Rawle, D.J., Li, D.S., Swedberg, J.E., Wang, L., Soares, D.C., and Harrich, D. (2018). HIV-1 Uncoating and Reverse Transcription Require eEF1A Binding to Surface-Exposed Acidic Residues of the Reverse Transcriptase Thumb Domain. *Mbio* *9*.
- Redecke, V., Hacker, H., Datta, S.K., Fermin, A., Pitha, P.M., Broide, D.H., and Raz, E. (2004). Cutting edge: Activation of toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* *172*, 2739-2743.
- Redfield, R.R., Birx, D.L., Ketter, N., Tramont, E., Polonis, V., Davis, C., Brundage, J.F., Smith, G., Johnson, S., Fowler, A., *et al.* (1991). A Phase I Evaluation of the Safety and Immunogenicity of Vaccination with Recombinant gp160 in Patients with Early Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine* *324*, 1677-1684.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Prensri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., *et al.* (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine* *361*, 2209-2220.
- Richert, L., Hue, S., Hocini, H., Raimbault, M., Lacabaratz, C., Surenaud, M., Wiedemann, A., Tisserand, P., Durier, C., Salmon, D., *et al.* (2013). Cytokine and gene transcription profiles of immune responses elicited by HIV lipopeptide vaccine in HIV-negative volunteers. *Aids* *27*, 1421-1431.
- Richert, L., Wiedemann, A., Launay, O., Lucht, F., Poizot-Martin, I., Lacabaratz, C., Hocini, H., Lhomme, E., Bauduin, C., Surenaud, M., *et al.* (2018). T-cell and Transcriptomic Responses to Primeboost Strategies of 3 HIV Vaccines (MVA HIV-B; LIPO-5; GTU-MultiHIV B) - ANRS/INSERM VRI01 Trial. In *HIVR4P (Madrid)*.
- Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., and Petropoulos, C.J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 4144-4149.
- Rinaldo, C., Huang, X.L., Fan, Z., Ding, M., Beltz, L., Logar, A., Panicali, D., Mazzara, G., Liebmann, J., Cottrili, M., *et al.* (1995). High-Levels of Anti-Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 (HIV-1) Memory Cytotoxic T-Lymphocyte Activity and Low Viral Load Are Associated with Lack of Disease in Hiv-1-Infected Long-Term Nonprogressors. *Journal of Virology* *69*, 5838-5842.
- Riviere, Y., Mcchesney, M.B., Porrot, F., Tanneausalvadori, F., Sansonetti, P., Lopez, O., Pialoux, G., Feuillie, V., Mollereau, M., Chamaret, S., *et al.* (1995). Gag-Specific Cytotoxic Responses to Hiv Type-1 Are Associated with a Decreased Risk of Progression to Aids-Related Complex or Aids. *Aids Research and Human Retroviruses* *11*, 903-907.
- Robb, M.L., Rerks-Ngarm, S., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Kunasol, P., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Morgan, P., Benenson, M., *et al.* (2012). Risk behaviour and time as covariates for efficacy of the HIV vaccine regimen ALVAC-HIV (vCP1521) and AIDSVAX B/E: a post-hoc analysis of the Thai phase 3 efficacy trial RV 144. *The Lancet Infectious Diseases* *12*, 531-537.
- Robert-Guroff, M., Brown, M., and Gallo, R.C. (1985). HTLV-III-neutralizing antibodies in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature* *316*, 72-74.
- Roberts, E.R., Carnathan, D.G., Li, H., Shaw, G.M., Silvestri, G., and Betts, M.R. (2016). Collapse of Cytolytic Potential in SIV-Specific CD8+ T Cells Following Acute SIV Infection in Rhesus Macaques. *PLOS Pathogens* *12*, e1006135.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E., and Hahn, B.H. (1995). Recombination in HIV-1. *Nature* *374*, 124-126.
- Rock, K.L., Reits, E., and Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology* *37*, 724-737.
- Rodger, A.J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Degen, O., Corbelli, G.M., Estrada, V., Geretti, A.M., Beloukas, A., *et al.* (2019). Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *The Lancet* *393*, 2428-2438.
- Rodger, A.J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., van Lunzen, J., Corbelli, G.M., Estrada, V., Geretti, A.M., Beloukas, A., *et al.* (2016). Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *Jama* *316*, 171.
- Rolland, M., Nickle, D.C., and Mullins, J.I. (2007). HIV-1 Group M Conserved Elements Vaccine. *PLoS Pathogens* *3*, e157.
- Rolland, M., Tovanabutra, S., deCamp, A.C., Frahm, N., Gilbert, P.B., Sanders-Buell, E., Heath, L., Magaret, C.A., 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.

- Rook, A.H., Lane, H.C., Folks, T., McCoy, S., Alter, H., and Fauci, A.S. (1987). Sera from HTLV-III/LAV Antibody-Positive Individuals Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against HTLV-III/Lav-Infected T-Cells. *J Immunol* **138**, 1064-1067.
- Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A., and Walker, B.D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4(+) T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**, 1447-1450.
- Rotzschke, O., and Falk, K. (1994). Origin, Structure and Motifs of Naturally Processed MHC Class-II Ligands. *Current Opinion in Immunology* **6**, 45-51.
- Rowland-Jones, S.L., Dong, T., Fowke, K.R., Kimani, J., Krausa, P., Newell, H., Blanchard, T., Ariyoshi, K., Oyugi, J., Ngugi, E., *et al.* (1998). Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *Journal of Clinical Investigation* **102**, 1758-1765.
- Rozenbaum, W., Coulaud, J.P., Saimot, A.G., Klatzmann, D., Mayaud, C., and Carette, M.F. (1982). Multiple Opportunistic Infection in a Male-Homosexual in France. *Lancet* **1**, 572-573.
- Ruiz-Riol, M., Llano, A., Ibarondo, J., Zamarreno, J., Yusim, K., Bach, V., Mothe, B., Perez-Alvarez, S., Fernandez, M.A., Requena, G., *et al.* (2015). Alternative Effector-Function Profiling Identifies Broad HIV-Specific T-Cell Responses in Highly HIV-Exposed Individuals Who Remain Uninfected. *Journal of Infectious Diseases* **211**, 936-946.
- Sacha, J.B., Chung, C., Rakasz, E.G., Spencer, S.P., Jonas, A.K., Bean, A.T., Lee, W., Burwitz, B.J., Stephany, J.J., Loffredo, J.T., *et al.* (2007). Gag-specific CD8(+) T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J Immunol* **178**, 2746-2754.
- Sáez-Cirión, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., *et al.* (2013). Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathogens* **9**, e1003211.
- Saez-Cirion, A., Lacabaratz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barre-Sinoussi, F., Delfraissy, J.F., Sinet, M., Pancino, G., *et al.* (2007). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection *ex vivo* and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 6776-6781.
- Sáez-Cirión, A., Sinet, M., Shin, S.Y., Urrutia, A., Versmisse, P., Lacabaratz, C., Boufassa, F., Avettand-Fenoël, V., Rouzioux, C., Delfraissy, J.-F., *et al.* (2009). Heterogeneity in HIV Suppression by CD8 T Cells from HIV Controllers: Association with Gag-Specific CD8 T Cell Responses. *The Journal of Immunology* **182**, 7828-7837.
- Saha, K., Bentsman, G., Chess, L., and Volsky, D.J. (1998). Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 *in vitro*. *Journal of Virology* **72**, 876-881.
- Sajadi, M.M., Guan, Y., DeVico, A.L., Seaman, M.S., Hossain, M., Lewis, G.K., and Redfield, R.R. (2011). Correlation Between Circulating HIV-1 RNA and Broad HIV-1 Neutralizing Antibody Activity. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **57**, 9-15.
- Salk, J. (1987). Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals. *Nature* **327**, 473-476.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., and Rowland, I. (2007). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* **80**, S147-S171.
- Salmon-Céron, D., Durier, C., Desaint, C., Cuzin, L., Surenaud, M., Hamouda, N.B., Lelièvre, J.-D., Bonnet, B., Pialoux, G., Poizot-Martin, I., *et al.* (2010). Immunogenicity and safety of an HIV-1 lipopeptide vaccine in healthy adults: a phase 2 placebo-controlled ANRS trial. *Aids* **24**, 2211-2223.
- Samri, A., Bacchus-Souffan, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Descours, B., Theodorou, I., Larsen, M., Saez-Cirion, A., Rouzioux, C., and Autran, B. (2016). Polyfunctional HIV-specific T cells in Post-Treatment Controllers. *Aids* **30**, 2299-2302.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.-M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., *et al.* (1996). Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725.
- Sandler, N.G., and Douek, D.C. (2012). Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 655-666.

- Sandor, F., and Buc, M. (2005). Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biologica* *51*, 188-197.
- Sauce, D., Gorochov, G., and Larsen, M. (2016). HIV-specific Th2 and Th17 responses predict HIV vaccine protection efficacy. *Scientific Reports* *6*.
- Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Pauchard, M., Ait-Mohand, H., Schneider, L., Guihot, A., Boufassa, F., Zaunders, J., Iguertsira, M., *et al.* (2011). HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* *117*, 5142-5151.
- Sauter, D., Schindler, M., Specht, A., Landford, W.N., Münch, J., Kim, K.-A., Votteler, J., Schubert, U., Bibollet-Ruche, F., Keele, B.F., *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.
- Scheid, J.F., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Kreider, E.F., Lu, C.L., Lorenzi, J.C.C., Feldmann, A., Braunschweig, M., Nogueira, L., Oliveira, T., *et al.* (2016). HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. *Nature* *535*, 556-+.
- Scherer, A., Frater, J., Oxenius, A., Agudelo, J., Price, D.A., Gunthard, H.F., Barnardo, M., Perrin, L., Hirschel, B., Phillips, R.E., *et al.* (2004). Quantifiable cytotoxic T lymphocyte responses and HLA-related risk of progression to AIDS. *P Natl Acad Sci USA* *101*, 12266-12270.
- Schieffer, M., Jessen, H.K., Oster, A.F., Pissani, F., Soghoian, D.Z., Lu, R., Jessen, A.B., Zedlack, C., Schultz, B.T., Davis, I., *et al.* (2014). Induction of Gag-Specific CD4 T Cell Responses during Acute HIV Infection Is Associated with Improved Viral Control. *Journal of Virology* *88*, 7357-7366.
- Schiller, J., and Chackerian, B. (2014). Why HIV Virions Have Low Numbers of Envelope Spikes: Implications for Vaccine Development. *PLoS Pathogens* *10*, e1004254.
- Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., *et al.* (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8(+) lymphocytes. *Science* *283*, 857-860.
- Schnittman, S.M., Lane, H.C., Greenhouse, J., Justement, J.S., Baseler, M., and Fauci, A.S. (1990). Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *87*, 6058-6062.
- Schouten, J., Wit, F.W., Stolte, I.G., Kootstra, N.A., van der Valk, M., Geerlings, S.E., Prins, M., Reiss, P., Reiss, P., Wit, F.W.N.M., *et al.* (2014). Cross-sectional Comparison of the Prevalence of Age-Associated Comorbidities and Their Risk Factors Between HIV-Infected and Uninfected Individuals: The AGEHIV Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases* *59*, 1787-1797.
- Schuitmaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., Degoede, R.E.Y., Vansteenkamp, R.P., Lange, J.M.A., Schattenkerk, J.K.M.E., Miedema, F., and Tersmette, M. (1992). Biological Phenotype of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Clones at Different Stages of Infection - Progression of Disease Is Associated with a Shift from Monocytotropic to T-Cell-Tropic Virus Populations. *Journal of Virology* *66*, 1354-1360.
- Schwartz, O., Marechal, V., LeGall, S., Lemonnier, F., and Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* *2*, 338-342.
- Sebina, I., and Pepper, M. (2018). Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. *Current Opinion in Immunology* *51*, 46-54.
- Seddiki, N., and Lévy, Y. (2018). Therapeutic HIV-1 vaccine. *Current Opinion in HIV and AIDS* *13*, 119-127.
- Seifert, U., Marañón, C., Shmueli, A., Desoutter, J.-F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., *et al.* (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nature Immunology* *4*, 375-379.
- Sela-Culang, I., Kunik, V., and Ofran, Y. (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. *Frontiers in Immunology* *4*.
- Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayarsina, R., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., *et al.* (1994). The Relationship between Class-I Binding Affinity and Immunogenicity of Potential Cytotoxic T-Cell Epitopes. *J Immunol* *153*, 5586-5592.

- Shah, K., and Nathanson, N. (1976). Human Exposure to Sv40: Review and Comment. *American Journal of Epidemiology* *103*, 1-12.
- Shankar, P., Xu, Z., and Lieberman, J. (1999). Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway. *Blood* *94*, 3084-3093.
- Sharp, P.M., Bailes, E., Robertson, D.L., Gao, F., and Hahn, B.H. (1999). Origins and Evolution of AIDS Viruses. *The Biological Bulletin* *196*, 338-342.
- Shisana, O., Rehle, T., Simbayi LC, Zuma, K., Jooste, S., Zungu N, Labadarios, D., and Onoya, D. (2014). South African National HIV Prevalence, Incidence and Behaviour Survey, 2012. (Cape Town, HSRC Press.).
- Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miiro, 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.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., 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.
- Smith, M.W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Lomb, D.A., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Kaslow, R., *et al.* (1997). Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* *277*, 959-965.
- Soghoian, D.Z., Jessen, H., Flanders, M., Sierra-Davidson, K., Cutler, S., Pertel, T., Ranasinghe, S., Lindqvist, M., Davis, I., Lane, K., *et al.* (2012). HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cell Responses During Acute HIV Infection Predict Disease Outcome. *Science Translational Medicine* *4*, 123ra125-123ra125.
- Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., *et al.* (2009). Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *Journal of Virology* *83*, 3719-3733.
- Stave, J.W., and Lindpaintner, K. (2013). Antibody and Antigen Contact Residues Define Epitope and Paratope Size and Structure. *The Journal of Immunology* *191*, 1428-1435.
- Steers, N.J., Currier, J.R., Jobe, O., Tovanabutra, S., Ratto-Kim, S., Marovich, M.A., Kim, J.H., Michael, N.L., Alving, C.R., and Rao, M. (2014). Designing the epitope flanking regions for optimal generation of CTL epitopes. *Vaccine* *32*, 3509-3516.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *Journal of Experimental Medicine* *137*, 1142-1162.
- Stott, E.J., Taffs, F., Kitchin, P., Chan, W.L., Mills, K.H.G., Page, M., Cranage, M., and Greenaway, P. (1990). Preliminary report: protection of cynomolgus macaques against simian immunodeficiency virus by fixed infected-cell vaccine. *The Lancet* *336*, 1538-1541.
- Stranford, S.A., Skurnick, J., Louria, D., Osmond, D., Chang, S.Y., Sninsky, J., Ferrari, G., Weinhold, K., Lindquist, C., and Levy, J.A. (1999). Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 1030-1035.
- Stranzl, T., Larsen, M.V., Lundegaard, C., and Nielsen, M. (2010). NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions. *Immunogenetics* *62*, 357-368.
- Streeck, H., Frahm, N., and Walker, B.D. (2009). The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat Protoc* *4*, 461-469.
- Streeck, H., Lu, R., Beckwith, N., Milazzo, M., Liu, M., Routy, J.P., Little, S., Jessen, H., Kelleher, A.D., Hecht, F., *et al.* (2014). Emergence of Individual HIV-Specific CD8 T Cell Responses during Primary HIV-1 Infection Can Determine Long-Term Disease Outcome. *Journal of Virology* *88*, 12793-12801.
- Summers deLuca, L., and Gommerman, J.L. (2012). Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nature Reviews Immunology* *12*, 339-351.
- Surenaud, M., Lacabaratz, C., Zurawski, G., Lévy, Y., and Lelièvre, J.-D. (2017). Development of an epitope-based HIV-1 vaccine strategy from HIV-1 lipopeptide to dendritic-based vaccines. *Expert Review of Vaccines* *16*, 955-972.

- Suthar, A.B., Ford, N., Bachanas, P.J., Wong, V.J., Rajan, J.S., Saltzman, A.K., Ajose, O., Fakoya, A.O., Granich, R.M., Negussie, E.K., *et al.* (2013). Towards Universal Voluntary HIV Testing and Counselling: A Systematic Review and Meta-Analysis of Community-Based Approaches. *PLoS Medicine* *10*, e1001496.
- Tagnouokam Ngoupo, P.A., Sadeuh-Mba, S.A., De Oliveira, F., Ngo-Malabo, E.T., Ngono, L., Plantier, J.-C., Kfutwah, A., and Njouom, R. (2018). Short Communication: Characterization of a New HIV-1 Group N Isolate Originating from a Cameroonian Patient. *AIDS Research and Human Retroviruses* *34*, 621-625.
- Tian, X., Zhang, A., Qiu, C., Wang, W., Yang, Y., Qiu, C., Liu, A., Zhu, L., Yuan, S., Hu, H., *et al.* (2015). The Upregulation of LAG-3 on T Cells Defines a Subpopulation with Functional Exhaustion and Correlates with Disease Progression in HIV-Infected Subjects. *The Journal of Immunology* *194*, 3873-3882.
- Tobian, A.A.R., Kacker, S., and Quinn, T.C. (2014). Male Circumcision: A Globally Relevant but Under-Utilized Method for the Prevention of HIV and Other Sexually Transmitted Infections. *Annual Review of Medicine* *65*, 293-306.
- Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., *et al.* (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 9019-9024.
- Tomaras, G.D., and Plotkin, S.A. (2017). Complex immune correlates of protection in HIV-1 vaccine efficacy trials. *Immunological Reviews* *275*, 245-261.
- Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., *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.
- Tomescu, C., Abdulhaqq, S., and Montaner, L.J. (2011). Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clinical & Experimental Immunology* *164*, 158-169.
- Tomiya, H., Akari, H., Adachi, A., and Takiguchi, M. (2002). Different Effects of Nef-Mediated HLA Class I Down-Regulation on Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD8+ T-Cell Cytolytic Activity and Cytokine Production. *Journal of Virology* *76*, 7535-7543.
- Torres-Anjel, M.J. (1992). Macroepidemiology of the HIVs-AIDS (HAIDS) Pandemic Insufficiently Considered Zoological and Geopolitical Aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences* *653*, 257-273.
- Townsend, A.R.M., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A.J. (1986). The Epitopes of Influenza Nucleoprotein Recognized by Cytotoxic Lymphocytes-T Can Be Defined with Short Synthetic Peptides. *Cell* *44*, 959-968.
- Trama, Ashley M., Moody, M.A., Alam, S.M., Jaeger, Frederick H., Lockwood, B., Parks, R., Lloyd, Krissey E., Stolarchuk, C., Scarce, R., Foulger, A., *et al.* (2014). HIV-1 Envelope gp41 Antibodies Can Originate from Terminal Ileum B Cells that Share Cross-Reactivity with Commensal Bacteria. *Cell Host & Microbe* *16*, 215-226.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.-R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., *et al.* (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine* *12*, 1198-1202.
- Trautmann, L., Mbitikon-Kobo, F.M., Goulet, J.P., Peretz, Y., Shi, Y., Van Grevenynghe, J., Procopio, F.A., Boulassel, M.R., Routy, J.P., Chomont, N., *et al.* (2012). Profound metabolic, functional, and cytolytic differences characterize HIV-specific CD8 T cells in primary and chronic HIV infection. *Blood* *120*, 3466-3477.
- Trautmann, L., Rimbart, M., Echasserieau, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V., and Bonneville, M. (2005). Selection of T Cell Clones Expressing High-Affinity Public TCRs within Human Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cell Responses. *The Journal of Immunology* *175*, 6123-6132.
- Trepel, F. (1974). Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift* *52*, 511-515.
- Trimble, L.A., and Lieberman, J. (1998). Circulating CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals have impaired function and downmodulate CD3 zeta, the signaling chain of the T-cell receptor complex. *Blood* *91*, 585-594.

- Troyer, R.M., McNevin, J., Liu, Y., Zhang, S.C., Krizan, R.W., Abraha, A., Tebit, D.M., Zhao, H., Avila, S., Lobritz, M.A., *et al.* (2009). Variable Fitness Impact of HIV-1 Escape Mutations to Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Response. *PLoS Pathogens* *5*, e1000365.
- Tsoukas, C.M., Raboud, J., Bernard, N.F., Montaner, J.S.G., Gill, M.J., Rachlis, A., Fong, I.W., Schlech, W., Djurdjev, O., Freedman, J., *et al.* (1998). Active Immunization of Patients with HIV Infection: A Study of the Effect of VaxSyn, a Recombinant HIV Envelope Subunit Vaccine, on Progression of Immunodeficiency. *AIDS Research and Human Retroviruses* *14*, 483-490.
- Tuen, M., Bimela, J.S., Banin, A.N., Ding, S., Harkins, G.W., Weiss, S., Itri, V., Durham, A.R., Porcella, S.F., Soni, S., *et al.* (2019). Immune Correlates of Disease Progression in Linked HIV-1 Infection. *Frontiers in Immunology* *10*.
- Tumiotto, C., Alves, B.M., Recordon-Pinson, P., Jourdain, M., Bellecave, P., Guidicelli, G.L., Visentin, J., Bonnet, F., Hessamfar, M., Neau, D., *et al.* (2019). Provir/Latitude 45 study: A step towards a multi-epitopic CTL vaccine designed on archived HIV-1 DNA and according to dominant HLA I alleles. *Plos One* *14*.
- Tumiotto, C., Riviere, L., Bellecave, P., Recordon-Pinson, P., Vilain-Parce, A., Guidicelli, G.L., Fleury, H., and Collaborating, P.L. (2017). Sanger and Next-Generation Sequencing data for characterization of CTL epitopes in archived HIV-1 proviral DNA. *Plos One* *12*.
- Tung, J., and Sant, A.J. (2013). Orchestration of CD4 T Cell Epitope Preferences after Multi-peptide Immunization. *The Journal of Immunology* *191*, 764-772.
- Vaccari, M., Fourati, S., Gordon, S.N., Brown, D.R., Bissa, M., Schifanella, L., de Castro, I.S., Doster, M.N., Galli, V., Omsland, M., *et al.* (2018). HIV vaccine candidate activation of hypoxia and the inflammasome in CD14(+) monocytes is associated with a decreased risk of SIVmac251 acquisition. *Nature Medicine* *24*, 847-+.
- Vaccari, M., Gordon, S.N., Fourati, S., Schifanella, L., Liyanage, N.P.M., Cameron, M., Keele, B.F., Shen, X., Tomaras, G.D., Billings, E., *et al.* (2016). Adjuvant-dependent innate and adaptive immune signatures of risk of SIVmac251 acquisition. *Nature Medicine* *22*, 762-770.
- Valle-Casuso, J.C., Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Monceaux, V., Mikhailova, A., Bourdic, K., Avettand-Fenoel, V., Boufassa, F., Sitbon, M., *et al.* (2019). Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4+ T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection. *Cell Metabolism* *29*, 611-626.e615.
- Van de Perre, P., Clumeck, N., Carael, M., Nzabihimana, E., Robertguroff, M., Demol, P., Freyens, P., Butzler, J.P., Gallo, R.C., and Kanyamupira, J.B. (1985). Female Prostitutes - a Risk Group for Infection with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-III. *Lancet* *2*, 524-527.
- Van de Perre, P., Jacobs, D., and Sprecher-Goldberger, S. (1987). The latex condom, an efficient barrier against sexual transmission of AIDS-related viruses. *AIDS* *1*, 49-52.
- van der Vliet, H.J.J., von Blomberg, B.M.E., Hazenberg, M.D., Nishi, N., Otto, S.A., van Benthem, B.H., Prins, M., Claessen, F.A., van den Eertwegh, A.J.M., Giaccone, G., *et al.* (2002). Selective Decrease in Circulating Vα24+Vβ11+ NKT Cells During HIV Type 1 Infection. *The Journal of Immunology* *168*, 1490-1495.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., *et al.* (2006). SIV infection in wild gorillas. *Nature* *444*, 164-164.
- vanBaalén, C.A., Pontesilli, O., Huisman, R.C., Geretti, A.M., Klein, M.R., deWolf, F., Miedema, F., Gruters, R.A., and Osterhaus, A.D.M.E. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *Journal of General Virology* *78*, 1913-1918.
- Vancott, T.C., Polonis, V.R., Loomis, L.D., Michael, N.L., Nara, P.L., and Bix, D.L. (1995). Differential Role of V3-Specific Antibodies in Neutralization Assays Involving Primary and Laboratory-Adapted Isolates of HIV Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses* *11*, 1379-1391.
- Vargas-Inchaustegui, D.A., Xiao, P., Tuero, I., Patterson, L.J., and Robert-Guroff, M. (2012). NK and CD4+ T Cell Cooperative Immune Responses Correlate with Control of Disease in a Macaque Simian Immunodeficiency Virus Infection Model. *The Journal of Immunology* *189*, 1878-1885.
- Velu, V., Titanji, K., Zhu, B.G., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L.L., Vanderford, T.H., Chennareddi, L., Silvestri, G., Freeman, G.J., *et al.* (2009). Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* *458*, 206-U205.

- Verhofstede, C., Nijhuis, M., and Vandekerckhove, L. (2012). Correlation of coreceptor usage and disease progression. *Current Opinion in HIV and AIDS* 7, 432-439.
- Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., Sema, H., Tshimanga, K., Bongo, B., and Delaporte, E. (2000). Unprecedented Degree of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Group M Genetic Diversity in the Democratic Republic of Congo Suggests that the HIV-1 Pandemic Originated in Central Africa. *Journal of Virology* 74, 10498-10507.
- Vieira, J., Frank, E., Spira, T.J., and Landesman, S.H. (1983). Acquired Immune Deficiency in Haitians. *New England Journal of Medicine* 308, 125-129.
- Vingert, B., Perez-Patrigeon, S., Jeannin, P., Lambotte, O., Boufassa, F., Lemaître, F., Kwok, W.W., Theodorou, I., Delfraissy, J.-F., Thèze, J., *et al.* (2010). HIV Controller CD4+ T Cells Respond to Minimal Amounts of Gag Antigen Due to High TCR Avidity. *PLoS Pathogens* 6, e1000780.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology* 15, 388-400.
- Wagner, L., Yang, O.O., Garcia-Zepeda, E.A., Ge, Y., Kalams, S.A., Walker, B.D., Pasternack, M.S., and Luster, A.D. (1998).  $\beta$ -Chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391, 908-911.
- Walker, B.D., Chakrabarti, S., Moss, B., Paradis, T.J., Flynn, T., Durno, A.G., Blumberg, R.S., Kaplan, J.C., Hirsch, M.S., and Schooley, R.T. (1987). HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328, 345-348.
- Walker, C., Moody, D., Stites, D., and Levy, J. (1986). CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234, 1563-1566.
- Walsh, S.R., Moodie, Z., Fiore-Gartland, A.J., Morgan, C., Wilck, M.B., Hammer, S.M., Buchbinder, S.P., Kalams, S.A., Goepfert, P.A., Mulligan, M.J., *et al.* (2016). Vaccination With Heterologous HIV-1 Envelope Sequences and Heterologous Adenovirus Vectors Increases T-Cell Responses to Conserved Regions: HVTN 083. *Journal of Infectious Diseases* 213, 541-550.
- Wang, X., Zhang, Z., Zhang, S., Fu, J., Yao, J., Jiao, Y., Wu, H., and Wang, F.-S. (2008). B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *European Journal of Immunology* 38, 3226-3236.
- Wang, Y.Y.E., Li, B., Carlson, J.M., Streeck, H., Gladden, A.D., Goodman, R., Schneidewind, A., Power, K.A., Toth, I., Frahm, N., *et al.* (2009). Protective HLA Class I Alleles That Restrict Acute-Phase CD8(+) T-Cell Responses Are Associated with Viral Escape Mutations Located in Highly Conserved Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* 83, 1845-1855.
- Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., *et al.* (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307-312.
- Wei, X., and Nielsen, R. (2019). CCR5- $\Delta$ 32 is deleterious in the homozygous state in humans. *Nature Medicine* 25, 909-910.
- Weiss, R.A., Clapham, P.R., Cheingsong-Popov, R., Dalgleish, A.G., Carne, C.A., Weller, I.V.D., and Tedder, R.S. (1985). Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature* 316, 69-72.
- Wertheim, J.O., and Worobey, M. (2009). Dating the Age of the SIV Lineages That Gave Rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Computational Biology* 5, e1000377.
- Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., *et al.* (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512, 74-77.
- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 10985-10990.
- Wilson, J.D.K., Ogg, G.S., Allen, R.L., Davis, C., Shaunak, S., Downie, J., Dyer, W., Workman, C., Sullivan, J.S., McMichael, A.J., *et al.* (2000). Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *Aids* 14, 225-233.
- Winkler, C., Modi, W., Smith, M.W., Nelson, G.W., Wu, X.Y., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., *et al.* (1998). Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science* 279, 389-393.
- Wong, G.H., Krowka, J.F., Stites, D.P., and Goeddel, D.V. (1988). In vitro anti-human immunodeficiency virus activities of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *J Immunol* 140, 120-124.

- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D.E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J.-J., Kabongo, J.-M.M., Kalengayi, R.M., Van Marck, E., *et al.* (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**, 661-664.
- Worobey, M., Watts, T.D., McKay, R.A., Suchard, M.A., Granade, T., Teuwen, D.E., Koblin, B.A., Heneine, W., Lemey, P., and Jaffe, H.W. (2016). 1970s and 'Patient 0' HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. *Nature* **539**, 98-101.
- Wren, L.H., Chung, A.W., Isitman, G., Kelleher, A.D., Parsons, M.S., Amin, J., Cooper, D.A., Stratov, I., Navis, M., and Kent, S.J. (2013). Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* **138**, 116-123.
- Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology* **6**, 859-868.
- Yang, O.O. (2009). Candidate Vaccine Sequences to Represent Intra- and Inter-Clade HIV-1 Variation. *PLoS ONE* **4**, e7388.
- Yaseen, M.M., Abuharfeil, N.M., Yaseen, M.M., and Shabsoug, B.M. (2017). The role of polymorphonuclear neutrophils during HIV-1 infection. *Archives of Virology* **163**, 1-21.
- Yates, N.L., Liao, H.X., Fong, Y., deCamp, A., Vandergrift, N.A., Williams, W.T., Alam, S.M., Ferrari, G., Yang, Z.y., Seaton, K.E., *et al.* (2014). Vaccine-Induced Env V1-V2 IgG3 Correlates with Lower HIV-1 Infection Risk and Declines Soon After Vaccination. *Science Translational Medicine* **6**, 228ra239-228ra239.
- Younas, M., Hue, S., Lacabaratz, C., Guguin, A., Wiedemann, A., Surenaud, M., Beq, S., Croughs, T., Lelievre, J.D., and Levy, Y. (2013). IL-7 Modulates In Vitro and In Vivo Human Memory T Regulatory Cell Functions through the CD39/ATP Axis. *J Immunol* **191**, 3161-3168.
- Younes, S.-A., Yassine-Diab, B., Dumont, A.R., Boulassel, M.-R., Grossman, Z., Routy, J.-P., and Sékaly, R.-P. (2003). HIV-1 Viremia Prevents the Establishment of Interleukin 2-producing HIV-specific Memory CD4+T Cells Endowed with Proliferative Capacity. *The Journal of Experimental Medicine* **198**, 1909-1922.
- Yu, X.G., Addo, M.M., Rosenberg, E.S., Rodriguez, W.R., Lee, P.K., Fitzpatrick, C.A., Johnston, M.N., Strick, D., Goulder, P.J.R., Walker, B.D., *et al.* (2002). Consistent Patterns in the Development and Immunodominance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific CD8+ T-Cell Responses following Acute HIV-1 Infection. *Journal of Virology* **76**, 8690-8701.
- Zagury, D. (1991). Anti-HIV cellular immunotherapy in AIDS. *The Lancet* **338**, 694-695.
- Zagury, D., Bernard, J., Cheynier, R., Desportes, I., Leonard, R., Fouchard, M., Reveil, B., Ittele, D., Lurhuma, Z., Mbayo, K., *et al.* (1988). A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1 induced by a candidate vaccine against AIDS. *Nature* **332**, 728-731.
- Zagury, D., Léonard, R., Fouchard, M., Réveil, B., Bernard, J., Ittelé, D., Cattan, A., Zirimwabagabo, L., Kalumbu, M., Justin, W., *et al.* (1987). Immunization against AIDS in humans. *Nature* **326**, 249-250.
- Zelinsky, G., Balkow, S., Schimmer, S., Werner, T., Simon, M.M., and Dittmer, U. (2007). The Level of Friend Retrovirus Replication Determines the Cytolytic Pathway of CD8+ T-Cell-Mediated Pathogen Control. *Journal of Virology* **81**, 11881-11890.
- Zeng, M., Haase, A.T., and Schacker, T.W. (2012). Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. *Trends in Immunology* **33**, 306-314.
- Zhang, L.M., Udaka, K., Mamitsuka, H., and Zhu, S.F. (2012a). Toward more accurate pan-specific MHC-peptide binding prediction: a review of current methods and tools. *Brief Bioinform* **13**, 350-364.
- Zhang, X.L., Dervillez, X., Chentoufi, A.A., Badakhshan, T., Bettahi, I., and BenMohamed, L. (2012b). Targeting the Genital Tract Mucosa with a Lipopeptide/Recombinant Adenovirus Prime/Boost Vaccine Induces Potent and Long-Lasting CD8(+) T Cell Immunity against Herpes: Importance of MyD88. *J Immunol* **189**, 4496-4509.
- Zhao, K., Ishida, Y., Oleksyk, T.K., Winkler, C.A., and Roca, A.L. (2012). Evidence for selection at HIV host susceptibility genes in a West Central African human population. *BMC Evolutionary Biology* **12**, 237.
- Zheng, N., Fujiwara, M., Ueno, T., Oka, S., and Takiguchi, M. (2009). Strong Ability of Nef-Specific CD4+ Cytotoxic T Cells To Suppress Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication in HIV-1-Infected CD4+ T Cells and Macrophages. *Journal of Virology* **83**, 7668-7677.

- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J.D., Grisé, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847-852.
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., and Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-597.
- Zhu, X., Ramos, T.V., Gras-Masse, H., Kaplan, B.E., and BenMohamed, L. (2004). Lipopeptide epitopes extended by an N<sup>ε</sup>-palmitoyl-lysine moiety increase uptake and maturation of dendritic cells through a Toll-like receptor-2 pathway and trigger a Th1-dependent protective immunity. *European Journal of Immunology* **34**, 3102-3114.
- Zinkernagel RM, W.R. (1976). H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J Immunol.*
- Zoete, V., Irving, M., Ferber, M., Cuendet, M.A., and Michielin, O. (2013). Structure-Based, Rational Design of T Cell Receptors. *Frontiers in Immunology* **4**.
- Zou, C.C., Murakoshi, H., Kuse, N., Akahoshi, T., Chikata, T., Gatanaga, H., Oka, S., Hanke, T., and Takiguchi, M. (2019). Effective Suppression of HIV-1 Replication by Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Pol Epitopes in Conserved Mosaic Vaccine Immunogens. *Journal of Virology* **93**.
- Zuniga, R., Lucchetti, A., Galvan, P., Sanchez, S., Sanchez, C., Hernandez, A., Sanchez, H., Frahm, N., Linde, C.H., Hewitt, H.S., *et al.* (2006). Relative Dominance of Gag p24-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Is Associated with Human Immunodeficiency Virus Control. *Journal of Virology* **80**, 3122-3125.

# **Annexes**

# I. Annexe 1 : Revue « Development of an epitope-based HIV-1 vaccine strategy from HIV-1 lipopeptide to dendritic-based vaccines »

EXPERT REVIEW OF VACCINES, 2017  
VOL. 16, NO. 10, 955–972  
<https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1374182>



REVIEW



## Development of an epitope-based HIV-1 vaccine strategy from HIV-1 lipopeptide to dendritic-based vaccines

Mathieu Surenaud<sup>a,b,c</sup>, Christine Lacabaratz<sup>a,b,c</sup>, Gérard Zurawski<sup>a,c,d</sup>, Yves Lévy<sup>a,b,c,e</sup> and Jean-Daniel Lelièvre<sup>a,b,c,e</sup>

<sup>a</sup>INSERM, U955, Créteil, France; <sup>b</sup>Faculté de médecine, Université Paris Est, Créteil, France; <sup>c</sup>Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, France; <sup>d</sup>Baylor Institute for Immunology Research, Dallas, TX, USA; <sup>e</sup>AP-HP, Hôpital H. Mondor – A. Chenevier, Service d'Immunologie Clinique et Maladies Infectieuses, Créteil, France

### ABSTRACT

**Introduction:** Development of a safe, effective and globally affordable Human Immunodeficiency Virus strain 1 (HIV-1) vaccine offers the best hope for future control of the HIV-1 pandemic. However, with the exception of the recent RV144 trial, which elicited a modest level of protection against infection, no vaccine candidate has shown efficacy in preventing HIV-1 infection or in controlling virus replication in humans. There is also a great need for a successful immunotherapeutic vaccine since combination antiretroviral therapy (cART) does not eliminate the reservoir of HIV-infected cells. But to date, no vaccine candidate has proven to significantly alter the natural history of an individual with HIV-1 infection.

**Areas covered:** For over 25 years, the ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites) has been committed to an original program combining basic science and clinical research developing an epitope-based vaccine strategy to induce a multi-epitopic cellular response against HIV-1. This review describes the evolution of concepts, based on strategies using HIV-1 lipopeptides towards the use of dendritic cell (DC) manipulation.

**Expert commentary:** Understanding the crucial role of DCs in immune responses allowed moving from the non-specific administration of HIV-1 sequences with lipopeptides to DC-based vaccines. These DC-targeting strategies should improve HIV-1 vaccine efficacy.

### ARTICLE HISTORY

Received 10 May 2017  
Accepted 29 August 2017

### KEYWORDS

DC-targeting; epitope; HIV-1; immunogenicity; lipopeptide; vaccine

## 1. Introduction

### 1.1. Vaccine-induced immunity basics

The aim of a vaccine is to induce a specific immune response to the immunogen that confers protection against infection or provides a therapeutic benefit. Humoral immune responses are based on B cell responses that generate antibodies against pathogen-specific antigens. Cellular immune responses are composed of pathogen-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells. CD8<sup>+</sup> T cells or cytotoxic T lymphocytes (CTL) kill infected cells by direct or indirect mechanisms. CD4<sup>+</sup> T cells or helper T lymphocytes (HTL) are conductors of adaptive immune responses notably through cell-contact and/or the release of cytokines that activate or regulate CD8<sup>+</sup> T cells, but also mediate B cell maturation and class switching to improve antibody affinity and quality. In this context, dendritic cells (DCs) are particularly important as they are the professional antigen-presenting cells (APCs). Indeed, DCs process protein antigens to present peptides in association with major histocompatibility complex (MHC) molecules to antigen-specific lymphocytes (i.e. T and B cells) in order to activate them and initiate the adaptive immunity [1]. CTL are usually primed by 8–11 amino acid (aa) peptides complexed to MHC class I molecules [2] and HTL by 12–20 aa peptides complexed to MHC class II molecules [3].

### 1.2. Early years of HIV-1 vaccine development

Since the identification of HIV-1 in 1983, several prophylactic and therapeutic anti-HIV-1 vaccine candidates have been tested in humans.

In the 1980s, different types of antibodies including neutralizing antibodies and others mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) were detected in HIV-1 infected patients [4,5]. Thus, recombinant envelope glycoprotein products were produced and successfully tested as vaccines in chimpanzees in the early 1990s [6]. Since protection of animals was observed when challenged with HIV-1, vaccine manufacturers focused on the envelope vaccine subunit. Different Phase I clinical trials using recombinant gp120 subunit started in humans but these vaccines did not elicit neutralizing antibodies to primary HIV-1 isolates [7]. In fact, the first doubts considering the generation of an effective antibody-based HIV-1 vaccine came as early as the discovery of the significant genetic diversity of HIV [8] and the strain-specific neutralizing activity of HIV-1 antibodies [9]. Moreover, the subsequent failure of recombinant gp120 vaccine in preventing HIV-1 infection in chimpanzees after a high dose intravenous challenge reinforced these concerns [10].

**CONTACT** Yves Lévy [yves.levy@aphp.fr](mailto:yves.levy@aphp.fr) INSERM, U955, Equipe 16, Créteil F-94010, France; Faculté de médecine, Université Paris Est, Créteil F-94010, France; Vaccine Research Institute (VRI), Créteil F-94010, France; AP-HP, Hôpital H. Mondor – A. Chenevier, Service d'Immunologie Clinique et Maladies Infectieuses, F-94010 Créteil, France.

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Because CTL are required to confer protective immunity against some viruses [11], other studies aimed to induce such HIV-1-specific T cells after vaccination. One way to obtain these CTL is the use of live attenuated vaccine that confers a complete immune response. However, as demonstrated with Simian Immunodeficiency Virus (SIV) in macaques [12], the risks were too great to justify using live attenuated HIV-1 vaccines in humans. So, since the late 1980s, live recombinant vectors containing only parts of the HIV-1 genome are used to induce CTL in HIV-1 therapeutic or prophylactic vaccination strategies [13,14]. Subsequently, new DNA plasmid technology was developed to elicit CTL and such DNA vaccines started to be tested for therapeutic and prophylactic applications [15]. Thus, in the 2000s most researchers believed that it should be possible to obtain at least partial vaccine protection through the induction of a strong and multi-epitopic cellular response.

Because CD8<sup>+</sup> T cells recognize viral peptides presented by MHC class I molecules on infected cells [16], peptide-based vaccine approaches developed in the late 1980s. This strategy offers several potential advantages over conventional approaches like whole protein, live attenuated virus or DNA immunizations in term of purity, lot-to-lot consistency, cost of production, and a highly specific immune response. Moreover, it was hypothesized that focusing immune response toward selected peptide determinants could be important to avoid inclusion of potentially harmful, e.g. autoimmune, epitopes in the vaccine and to focus immune responses to subdominant epitopes to broaden the response and thus prevent viral escape.

## 2. Body

### 2.1. Peptide vaccination, adjuvants, and the lipopeptide concept

In early studies, despite inducing HTL and antibody responses, synthetic peptides injected alone usually failed to induce CTL. In contrast, after injection of free synthetic peptides with incomplete Freund's adjuvant (IFA), CTL activity could be detected either for LCMV [17] or HIV-1 peptide immunization [18] and protection of mice against LCMV [19] and Sendai Virus [20] infection was observed in peptide-vaccinated animals.

Developed in the 1940s, Freund's adjuvant is composed of non-metabolizable oils with or without killed mycobacteria (complete and incomplete Freund's adjuvant, respectively, CFA and IFA). The powerful effects of these adjuvants, including delayed-type hypersensitivity (DTH), led chemists and immunologists to identify the factors responsible for their efficiency. These proved to be lipid content for IFA, together with other components, such as murein, lipopolysaccharide, lipoprotein, or glycan for CFA. In the following years, different active lipid compounds were identified.

Braun's lipoprotein was isolated from the outer membrane of Gram-negative *Escherichia coli* and was characterized more than 40 years ago as a B cell mitogen [21]. Tripalmitoyl-S-glyceryl-cysteine (Pam<sub>3</sub>Cys), an analog of the N-terminal part of this bacterial lipoprotein, was also shown to be a potent polyclonal activator for B cells, monocytes and macrophages

[22,23]. In 1989, a vaccine against foot-and-mouth disease virus (FMDV) composed of a synthetic peptide coupled to tripalmitoyl-S-glyceryl-cysteinylserine (P<sub>3</sub>CSS) was developed and shown to induce long-lasting antibody-mediated protection in guinea-pigs after a single administration [24]. The same year, Deres et al reported that a synthetic influenza peptide covalently linked to P<sub>3</sub>CSS could efficiently prime influenza virus-specific CTL *in vivo* whereas peptides injected alone could not [25]. This last study provided strong proof of concept of lipopeptide vaccine for the induction of CTL. Despite being a potent adjuvant, Pam<sub>3</sub>Cys has poor solubility properties. The dipalmitoyl-S-glyceryl-cysteine (Pam<sub>2</sub>Cys), analog of the macrophage-activating lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* (MALP2) was shown to be more soluble and even more potent than Pam<sub>3</sub>Cys for inducing antibody-mediated immunity [26]. Moreover, synthetic peptides linked to this compound were shown to activate DCs and elicit antibodies and CD8<sup>+</sup> T cell responses [27].

Coon and Hunter showed in guinea pigs that in contrast to the injection of bovine serum albumin (BSA) alone which stimulated production of large amounts of antibody, injection of lipid- (dodecanoic acid) conjugated BSA stimulated sustained DTH without detectable antibody production [28]. Interestingly, this change in the type of immune response was associated with a change in antigen localization within draining popliteal lymph nodes. Native BSA was localized in germinal centers whereas lipid conjugated-BSA was prominently localized in the T cell area. Soon after, Hunter and colleagues showed *in vitro* that lipid-conjugated BSA was taken up by macrophages 25–50-fold more efficiently than unconjugated BSA. They concluded that the capacity of lipophilic antigens to stimulate cell-mediated immune responses might be due to their increased uptake by macrophages, resulting in more efficient antigen presentation to specific T lymphocytes [29].

In the 1980–1990s, mice immunized with palmitoylated peptides coupled to Hepatitis B [30] or ovalbumin [31] peptides in CFA were shown to efficiently evoke specific antibodies. It was suggested that this adjuvant effect was due to the formation of large aggregates, possibly micelles, and to the enhancement of MHC class II-restricted presentation to T cells by the lipopeptide construct.

### 2.2. Cellular and molecular mechanisms of lipopeptide immunogenicity

P<sub>3</sub>CS lipopeptide was demonstrated to quickly penetrate macrophages plasma membrane and was detected within the cytoplasm, nuclear membrane and nucleus after 2 min of addition [32]. Schild and co-workers showed that optimal priming of a CTL epitope coupled to P<sub>3</sub>CSS required the covalent linkage between peptide and the lipophilic anchor after intravenous (i.v.) inoculation in mice [33]. The authors hypothesized that the lipid anchor could prolong half-life of the peptide *in vivo*, and/or allow the molecule to enter the MHC class I-restricted antigen processing pathway, and/or influence peptide localization *in vivo*, targeting the peptide to APCs and eventually activate them to secrete factors required for CTL differentiation. Interestingly, it was shown

that the antigenicity of peptides can be altered by serum proteases [34]. This suggested a further potential explanation for the enhanced *in vivo* immunogenicity of lipopeptides compared to free peptides and argued for the use of lipopeptides for peptide-based vaccine design.

The critical role of covalent association between peptide and lipid moiety for lipopeptide immunogenicity was confirmed using a N<sup>ε</sup>-palmitoyl lysine at the N-terminal end of a 25 aa peptide from HIV-1 Nef in rats. Indeed, T cell proliferation and cytokine secretion were observed after intraperitoneal (i.p.) injection of lipopeptide but not its non-lipidic peptide analog, even co-injected with palmitic acid [35].

A comparative study with different lipopeptides demonstrated three major findings [36]. First, the processing of a long (26 aa) bipalmitoyled lipopeptide was required for the induction of epitope-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells since this lipopeptide could not bind directly to MHC class I and class II molecules. Second, the particulate nature of lipopeptide constructs was crucial for immunogenicity as an inverse correlation was observed between the solubility of lipopeptide constructs and their ability to induce CTL *in vivo*. Third, after immunohistological analysis of tissue from subcutaneous (s.c.) immunized mice, the presence of cell-associated lipopeptide on spleen macrophages and DCs suggested the involvement of both of these cell populations in the processing and presentation of lipopeptide particles to CTLs.

Using the HIV-1 Pol 476–484 epitope linked at the N-terminus to a N<sup>ε</sup>-palmitoyl lysine, Loing and co-workers observed an increase of the life span of functional presentation to CTL specific for the parental peptide [37] and they showed that this monopalmityled lipopeptide was endocytosed by human DCs, which induced functional stimulation of specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes through a cross-presentation pathway [38]. Moreover, using two different long lipopeptides containing HIV-1 Pol and Nef peptides linked to N<sup>ε</sup>-palmitoyl lysine, Andrieu and co-workers demonstrated two different cross-presentation pathways [39]: one involving the proteasome and another involving the tripeptidyl peptidase II (TPPII), an acid-dependent endosomal enzyme with endoproteolytic activity [40]. Finally, these two long HIV-1 lipopeptides were also shown to be cross-presented by human plasmacytoid DCs [41]. However, the route of monopalmityled lipopeptides uptake was unclear since an endocytosis-independent presentation pathway by DCs was described [42]. Moreover, it was also shown that the nature of the bond between peptide and lipid chain participated to this pathway diversity and determined the immunogenicity of the construct [43]. Indeed, a labile thioester bond (S-palm) seemed to lead to an actin-independent endocytic route and a presentation in the context of MHC class II, whereas a stable amide bond (N-palm) seemed to induce the formation of micelles that travel via endoplasmic reticulum and complex with MHC class I molecules. Last but not least, the spacer amino acid composition between the peptide and the palmitic acid plays a role in the processing of lipopeptides [44], and thus in its immunogenicity [45].

In 1997, a human homologue of the *Drosophila* Toll protein – now known as Toll-like receptor (TLR) 4 – was discovered and its role in inducing innate responses including production of inflammatory cytokines and expression of co-stimulatory molecules was demonstrated [46]. TLRs are pattern recognition

receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecule patterns (PAMPs) derived from bacteria, virus, fungus or parasites [47]. Ten human TLRs have been identified and TLR-mediated stimulation leads to DC maturation, antigen presentation and cytokine secretion to induce HTL differentiation and CTL activation [48]. In 2001, Hertz and co-workers demonstrated that bacterial lipopeptides like P<sub>3</sub>CSSK<sub>4</sub> stimulated DC maturation via TLR-2 [49]. Interestingly, more than 10 years ago, and in contrast to monocholesterolated lipopeptides, monopalmitylated lipopeptides were also shown to stimulate DCs through the TLR2 pathway, leading to a strong Th1-dependant protective immunity against HSV-1 infection [50]. Figure 1 summarizes a global overview of lipopeptide immunogenicity (Figure 1a) and lipopeptide processing and presentation pathways (Figure 1b).

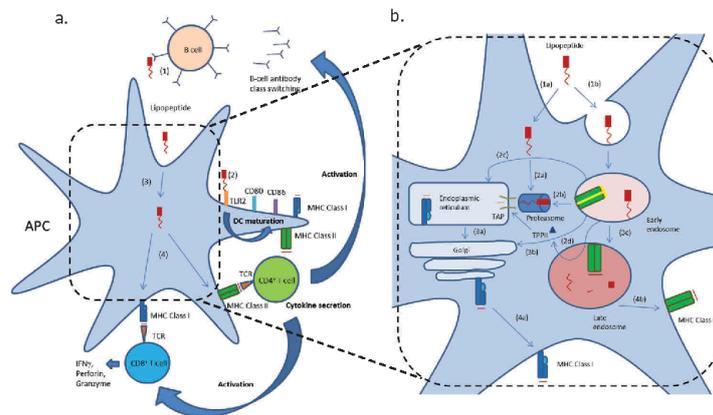
### 2.3. ANRS development of lipopeptides (animal models)

Soon after the 1989s publication of Deres and co-workers [25], the French Research Agency ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites) launched its strategy building upon the efforts of immunologists, biologists and chemists to produce an anti-HIV-1 lipopeptide vaccine. Since diacetylated peptides were more prone to form aggregates and were thus more difficult to purify, the focus was to develop single-tailed HIV-1 lipopeptides.

The first prototype tested was α-aminohexadecanoic acid (Hda) introduced at the C-terminal position of a 16 aa peptide containing the HIV-1 Env 315–329 MHC class I-restricted T cell immunodominant epitope and a second 34 aa peptide from Env recognized by HIV-1 neutralizing antibodies. In contrast to free peptides, i.p. injection of these lipopeptides induced strong primary CTL responses *in vivo* as well as HTL activation and antibody responses without adjuvant in mice. Furthermore, the high priming efficacy of the 34 aa lipopeptide suggested for the first time the possible advantage of large peptides containing multiple T cell epitopes [51].

The same type of construct (Hda lipopeptides) was then tested in the non-human primate (NHP) model [52], where a pool of seven SIV lipopeptides in IFA was injected s.c. to 12 macaques. A CTL response was found in seven animals and persisted at least up to 10 month after the last immunization. After i.v. infection with SIVmac251, the vaccine-induced CTL responses controlled SIV replication without fully eliminating the virus [53].

At the same time, similar lipopeptide constructs with influenza virus nucleoprotein (NP) were tested in mice [54]. Using i.p. or s.c. injections of lipopeptides without adjuvant, the authors confirmed the results obtained by Deres et al. after i.v. injection of NP 147–158 CTL epitope coupled to P<sub>3</sub>CSS, then showed that HTL were required for efficient CTL induction. As a proof of concept that CTL vaccine needs to contain many CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell epitopes in order to protect individuals irrespectively of their MHC class I and class II haplotypes, they designed and tested a 41 aa lipopeptide containing three colinear influenza CTL epitopes, each restricted to a different MHC class I haplotype. A CTL response was elicited to all three epitopes of this chimeric multirestricted construct, validating



**Figure 1. (a) Global overview of lipopeptide immunogenicity.** Lipopeptides injected as vaccines can directly activate B cells to produce antibodies (1). They can also drive DC phenotypic maturation through a TLR-2-dependent pathway (2), demonstrated by MHC class I and class II molecules and CD80 and CD86 costimulatory molecules expression and induce T-cell activation as described in [50]. Lipopeptides enter into APCs, particularly in DCs (3) to be processed and presented through MHC class I and class II molecules (4) and activate CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, respectively. **(b) Lipopeptide processing and presentation.** Lipopeptides can be internalized by cells via an energy-independent process (1a) as described in [42] or by energy-dependent endocytosis (1b) as described in [38]. After endocytosis, lipopeptides can be found in early endosomes and like lipopeptides internalized via endocytosis-independent pathway, then can reach the cytosol (2a and 2b) to be degraded by the proteasome, transported to endoplasmic reticulum via TAP and associated with MHC class I molecules to be exported via Golgi compartment (3a) to the cell surface (4a). Some lipopeptides can leave early endosomes to reach endoplasmic reticulum in a TAP-independent manner (2c) and/or accumulate in Golgi apparatus (3b) as described in [44]. Another possible route for lipopeptide processing is to follow the endosomal pathway and so to be degraded in late endosomes, associated with MHC class II molecules (3c), and then exported at the cell surface (4b) as described in [43]. But lipopeptides can also leave late endosome, reach the cytosol to be processed by TPP1I (2d) and generate some particular CD8<sup>+</sup> T cell epitopes as demonstrated in [40]. A lot of factors can influence the processing and presentation of lipopeptides like the nature of amino acid constituting the peptide sequence, the length of the peptide sequence, the nature of the coupled lipid, the site of attachment of the lipid (N-terminal or C-terminal), the nature of the bond between lipid chain and peptide, the presence of a spacer sequence and the formation of lipopeptide micelles.

APC: antigen presenting cell; DC: dendritic cell; MHC: major histocompatibility complex; TLR-2: Toll-like receptor 2; TCR: T-cell receptor; TAP: transporter associated with antigen processing; TPP1I: tripeptidyl peptidase II.

this approach for developing a synthetic lipopeptide vaccine for human use.

In the context of vaccination strategy, development of lipopeptides containing Hda would be difficult due to the presence of an uncontrolled asymmetric  $\alpha$ -carbon [55]. Based on the assumption that P<sub>3</sub>CSS-derived peptides possessed membrane anchoring functionality and considering the simplicity, solubility, low-cost and minimal toxicity of lipopeptide constructs, two new compound adducts with a lysine acylated by a palmitoyl- or a cholesterol-derived tail, were selected and compared to Hda and P<sub>3</sub>CSS for *in vivo* induction of CTL [56]. For this study, mice were immunized s.c. with different HIV-1 Env lipopeptides and a single modification by a lipidic amino acid resulted in the ability to induce a relevant CTL response without adjuvant. Since no clear difference was observed between the different lipopeptides, the palmitoyl-lysine construct was selected, mostly in view of a simpler synthesis and purification process.

Then, the previous seven lipopeptides injected in macaques were modified at their C-termini with a palmitoyl-lysine lipid moiety [57]. Two animals received three s.c. injections of the lipopeptide mixture (500  $\mu$ g of each) in IFA and were challenged six months later by i.v. injection of an SIV isolate. CTL responses from the two vaccinated macaques were directed against the same, single immunodominant Nef 128–137 epitope. However, 5 months after SIV infection, peripheral

blood mononuclear cells (PBMC) from both macaques lost their ability to be stimulated by autologous SIV-infected cells but retained their capacity to generate cytotoxic responses after specific Nef 128–137 peptide stimulation. These data suggested that CTL pressure led to the selection of viral variants and to the emergence of escape mutants supporting the notion that immunization should elicit broad CTL responses to be efficient.

The same lipopeptides were then co-administrated in eight macaques receiving three s.c. and intramuscular (i.m.) vaccine injections with a lipopeptide formulation containing a tetanus toxoid (TT 830–843) CD4<sup>+</sup> T cell promiscuous human epitope [58] in order to stimulate potential CD4<sup>+</sup> T cell help [59]. Multispecific CTL activity was detected only in animals having an IFN $\gamma$  CD4<sup>+</sup> T cell response directed to the TT epitope, suggesting that a T helper (Th)1 response elicited optimal differentiation of CTL responses. Fifteen days after i.v. challenge with SIVmac251, high levels of plasma viral RNA were observed in all vaccinated animals. However, three months after challenge, plasma RNA and proviral DNA in PBMC became undetectable in the animal having the most diverse CTL responses, i.e. recognizing 5 Nef and 1 Gag epitopes. The absence of CTL responses 12 months post-challenge in this animal suggested that vaccine-induced CTL could exert a selection of few-replicative and non-pathogenic viral variant following SIV infection [60].

In 2015, the LIPO-5 vaccine, composed of HIV-1 Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284, and Pol 325–355 peptidic sequences linked at the C-terminal to a monopalmityc acid via a lysine was developed for human clinical trials [61], and first used to immunize macaques in combination with a recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA)-HIV containing Gag, Nef and Pol protein sequences encompassing all the LIPO-5 peptides [62]. Different prime-boost strategies were tested and the results suggested that a LIPO-5 i.m. prime followed by a rMVA-HIV s.c. boost was the most effective combination to induce IFN $\gamma$  and IL-2 HIV-1-specific T cell responses. Interestingly, multiple LIPO-5 injections also induced HIV-1-specific antibodies that may be exploited in future combined vaccines to promote humoral responses.

#### 2.4. Selection of HIV-1 epitopes for human lipopeptide vaccines

In the late 1980s, HIV-1-specific CTL directed to Env, Pol, Gag or Nef proteins were described in HIV-1-infected individuals [63–65]. Moreover, in 1989, it was demonstrated for the first time that there was a physical association between MHC class I molecules and antigenic peptides [66]. These observations form the basis of the lipopeptide-based vaccine strategy developed by ANRS. Indeed, research teams participating in an ANRS-supported network described the use of binding/competition of peptides with human leukocyte antigen (HLA) molecules in order to map the polyepitopic domains of numerous HIV-1 proteins able to constitute the best immunogens [67–69]. The immunogenic character of these peptide fragments was verified by the induction of a CTL response. Several domains containing numerous multi-restricted CD8 $^+$  T cell epitopes recognized by seropositive donors with a CTL response against Nef protein were identified in the central region of the Nef protein [70]. Analysis of the variability of these Nef epitopes in patients revealed that selection pressure may result in mutations in certain epitopes leading to a marked reduction in CTL activity. In fact, some of these mutations at major anchor positions prevented HLA/peptide binding, and consequently impaired recognition of the HLA-peptide complex by the T cell receptor, and thus could facilitate virus persistence [71]. In a vaccine strategy based on immunogenic peptides inducing a polyclonal CTL response, this study indicated that it was necessary to design large peptide fragments containing ‘clusters’ of epitopes which correspond to several haplotypes. To further mitigate the risk of failure, it was necessary to select immunogenic epitopes in the most conserved regions of HIV-1. The peptide selection criteria were notably a strong affinity for class I molecules, the capacity to form a stable complex with these molecules, and the ability to induce CTL cytolytic activity. Similar work was then performed to map HIV-1 CD4 $^+$  T cell epitopes that bind to MHC class II molecules. Thus, regions containing ‘clusters’ of CD8 $^+$  and CD4 $^+$  T cell epitopes for different haplotypes, identified by research teams of the ANRS-supported network [67–73] or by others [74–78] were selected. After selection of the peptidic sequences included in the lipopeptide vaccines sponsored by the ANRS, several studies described HIV-1 CD4 $^+$  [79–83] and CD8 $^+$  [84–86] immunodominant and conserved T cell epitopes that were totally or in part included in these lipopeptide vaccine candidates, highlighting the potential

importance of these sequences for an effective HIV-1 vaccine. Figures 2 and 3 represent CD8 $^+$  and CD4 $^+$  T cell epitope maps covering the LIPO-5 sequences embodied in the latest anti-HIV-1 lipopeptide vaccine candidate developed by the ANRS [61]. Even though the peptidic sequences included in the lipopeptide vaccine candidates developed by the ANRS were selected from HIV-1 clade B (LAI subtype), the major circulating clade in Europe and North America, immunodominant regions from the Nef protein were shown to be cross-clade conserved and recognized by HIV-1 CRF02\_AG-infected Ivorian [87].

#### 2.5. Lipopeptide vaccination against HIV-1 with monopalmitylated constructs

Mono- and di-palmitylated lipopeptides vaccine candidates have been developed for a large panel of human diseases other than AIDS, e.g. malaria, melanoma, Herpes Simplex Virus, and Human Papilloma Virus (HPV) for Pam-Lys formulation [88–92]; Hepatitis B Virus and Human Cytomegalo Virus for Pam $_2$ Lys formulation [93,94]; Hepatitis C Virus, HPV and Influenza for Pam $_2$ Cys formulation [95–97]. Now, we will focus on the clinical development of monopalmitylated lipopeptide vaccine against HIV-1.

The ANRS vaccine strategy based on lipopeptides was evaluated in humans in several phase I and II clinical trials (Tables 1 and 2). In some of them, lipopeptides were combined with viral recombinant vectors, or more recently with DNA plasmid vectors into which genes coding for different HIV-1 protein sequences were inserted.

##### 2.5.1. Lipopeptide formulations evaluated in healthy volunteers

LIPO-6 consisted of a mixture of six peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 66–97, Nef 117–147, Nef 182–205, Gag 183–214, Gag 253–284, Env 303–335) modified at the C-terminal position by the addition of a palmitoyl-lysylamide group [98]. This lipopeptide vaccine was tested in the ANRS VAC04 trial, the first phase I anti-HIV-1 prophylactic clinical trial using lipopeptides in humans and sponsored by the ANRS [99,100]. The various doses of each lipopeptide injected with or without QS21 adjuvant at week 0, 4, and 12 were well tolerated and the volunteers received a fourth (booster) injection at week 48 [101]. After three immunizations, anti-HIV-1-specific IgG (ELISA on sera), CD4 $^+$  (proliferation assay on fresh PBMC), and CD8 $^+$  (IFN $\gamma$  ELISpot after a one-step stimulation to amplify specific cells) T cells were detected in 89%, 79%, and 71% of vaccinated subjects, respectively. Gag 253–284 peptide was found to be extremely immunogenic and was recognized by all vaccinated subjects. The booster injection at week 48 increased the breadth of CD8 $^+$  T cell response. Moreover, it seemed that the fourth injection increased avidity of the TCR leading to the recognition of mutated peptide by cross-reaction, suggesting a possible protection mechanism for populations exposed to different HIV-1 variants. Globally, the majority or responders induced and maintained multiepitopic B and T cell responses, which were still detectable 2 years after the first immunization in more than half of the vaccinees. A QS21 positive effect was observed on the sustained B cell and CD4 $^+$  T cell responses at week 104. LIPO-6 was also shown

960 M. SURENAUD ET AL.

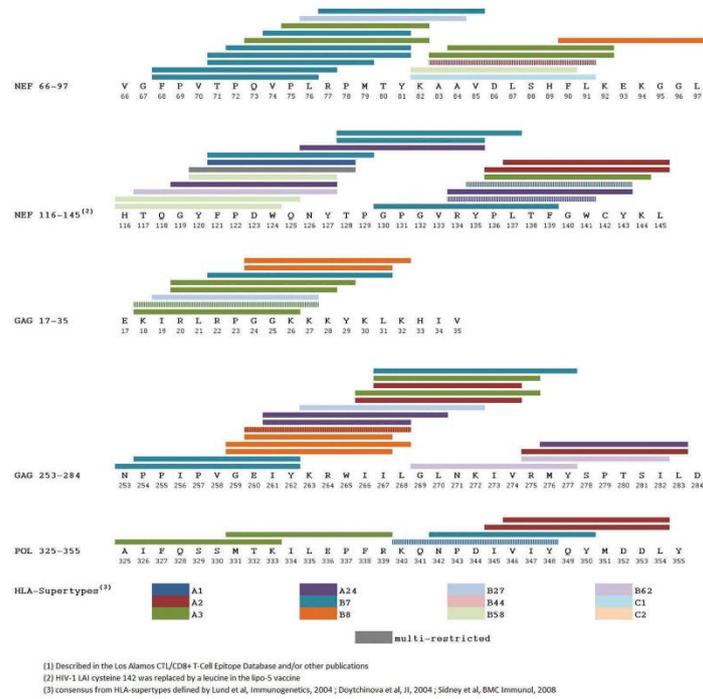


Figure 2. LIPO-5 CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes map<sup>(1)</sup>.

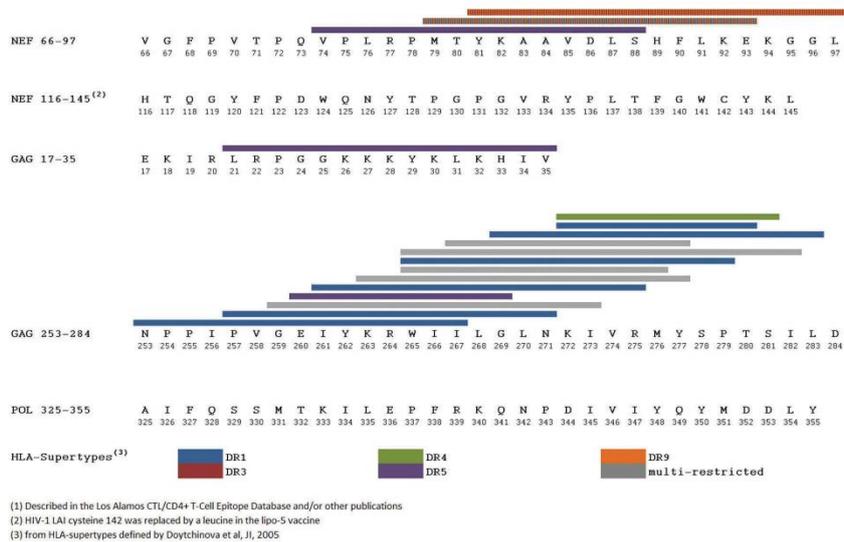


Figure 3. LIPO-5 CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes map<sup>(1)</sup>.

Downloaded by [Mathieu SURENAUD] at 10:12 27 November 2017

Table 1. Characteristics of ANRS clinical trials evaluating HIV lipopeptide vaccine formulations in healthy volunteers.

Trial	Clinical phase	Sponsor	Date	Number of subjects	Lipopeptide vaccine (route)	Associated vaccines (route)	Immunization regimen	Adjuvants	CD4 response rate (proliferation assay) <sup>a</sup>	CD8 response rate (IFN $\gamma$ ELISpot assay) <sup>ab</sup>
VAC 04	I	ANRS	1996–2000	28 (divided into six groups)	LIPO-6 (IM)	–	4 × LIPO-6 (100 $\mu$ g) 4 × LIPO-6 (100 $\mu$ g) 4 × LIPO-6 (250 $\mu$ g) 4 × LIPO-6 (250 $\mu$ g) 4 × LIPO-6 (500 $\mu$ g) 4 × LIPO-6 (500 $\mu$ g)	Q5-21 Q5-21 Q5-21	82% <sup>c</sup> 77% <sup>d</sup>	77% <sup>c</sup> 50% <sup>d</sup>
VAC 09	I	ANRS	1997–1999	23 (divided into two groups)	LIPO-6 (IM)	vCP205 (IM) vCP300 (IM)	Boosting immunization for ANRS VAC 03 volunteers who previously received 5 × vCP205 2 × LIPO-6 (500 $\mu$ g) Boosting immunization for ANRS VAC 07 volunteers who previously received 4 or 5 × vCP300	Q5-21 Q5-21	NA	NA
VAC 09bis	I	ANRS	1998–1999	21	LIPO-6	–	Boosting immunization for ANRS VAC 04 volunteers who previously received 4 × LIPO-6	Q5-21	NA	NA
VAC 10	I	Aventis	1999–2003	55 (divided into four groups)	LIPO-5 (IM) LIPO-6T (IM)	vCP1452 (IM)	5 × LIPO-5 5 × LIPO-6T 5 × (LIPO-6T + vCP1452) 5 × vCP1452	– –	NA –	NA –
VAC 12	I	Biovect	2001–2002	15	LIPO-4 (IM)	–	3 × LIPO-4	–	NA	NA
VAC 16	Ib	ANRS	2004–2005	68 (divided into two groups)	LIPO-4 (IM or ID)	–	3 × LIPO-4 (IM = 500 $\mu$ g) 3 × LIPO-4 (ID = 100 $\mu$ g)	– –	85% 61%	16% 16%
VAC 17	I	ANRS	2001–2002	35 (divided into two groups)	LIPO-6T (IM)	vCP1452 (IM)	1 × LIPO-6T Boosting immunization for ANRS VAC 10 volunteers who previously received 5 × LIPO-5, LIPO-6T, LIPO6T + vCP1452, or vCP1452	–	NA	NA
VAC 18	II	ANRS	2004–2008	132 (divided into four groups)	LIPO-5 (IM)	–	1 × LIPO-6T First immunization in naive volunteers 4 × LIPO-5 (50 $\mu$ g) 4 × LIPO-5 (150 $\mu$ g) 4 × LIPO-5 (500 $\mu$ g) 4 × Placebo (vaccine diluent)	– –	17% 27% 15% 0%	71% 59% 70% 25%

(Continued)

Table 1. (Continued).

Trial	Clinical phase	Sponsor	Date	Number of subjects	Lipo-peptide vaccine (route)	Associated vaccines (route)	Immunization regimen	Adjuvants	CD4 response rate (proliferation assay) <sup>a</sup>	CD8 response rate (IFN $\gamma$ ELISpot assay) <sup>a,b</sup>
HVTN 042/ANRS VAC 19	II	NIH	2004–2005	174 (divided into 10 groups)	LIPO-5 (IM)	VCP1452 (IM)	4 $\times$ LIPO-5 (500 $\mu$ g) or placebo (vaccine diluent) 4 $\times$ VCP1452 or placebo (vaccine diluent) 2 $\times$ VCP1452/2 $\times$ VCP1452 + LIPO-5 (500 $\mu$ g) or placebo (vaccine diluent) 2 $\times$ VCP1452/2 $\times$ VCP1452 + LIPO-5 (150 $\mu$ g) or placebo (vaccine diluent) 2 $\times$ VCP1452/2 $\times$ VCP1452 + LIPO-5 (500 $\mu$ g) or placebo (vaccine diluent)	– –	NA	NA
ANRS/VR1 01	I/II	INSERM/ ANRS	2014–2016	92 (divided into four groups)	LIPO-5 (IM)	MVA-HIV B (IM) GTU-Multi HIV B (IM)	2 $\times$ MVA/2 $\times$ LIPO-5 2 $\times$ LIPO-5/2 $\times$ MVA 3 $\times$ GTU/2 $\times$ LIPO-5 3 $\times$ GTU/2 $\times$ MVA	– –	NA	NA

<sup>a</sup>Response rate after three or four lipo-peptide inoculations and evaluated 2–4 weeks after the last injection.

<sup>b</sup>IFN $\gamma$  ELISpot was performed after one-step stimulation (cultured ELISpot assay).

<sup>c</sup>All vaccine recipients receiving 100, 250, and 500  $\mu$ g doses without QS-21 confounded.

<sup>d</sup>All vaccine recipients receiving 100, 250, and 500  $\mu$ g doses with QS-21 confounded.

HIV: human immunodeficiency virus; HVTN: HIV Vaccine Trial Network; ANRS: France Recherche Nord&Sud Sids-HIV hépatites; VRI: Vaccine Research Institute; NIH: National Institutes of Health; INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; IM: intramuscular; ID: intradermal; MVA: Modified Vaccinia Ankara.

LIPO-4: mixture of four peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Gag 77–85, Pol-RT 342–354, Pol 476–484, and Nef 62–82). Each peptide was co-linearly associated with the TT 830–843 HTL epitope from tetanus toxoid which was linked at the N-terminal to a monopalmitic acid via a lysine.

LIPO-5: mixture of five peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284, and Pol 325–355) linked at the C-terminal to a monopalmitic acid via a lysine.

LIPO-6: mixture of six peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 66–97, Nef 117–147, Nef 182–205, Gag 183–214, Gag 253–284, and Pol 325–355) and modified in C-terminal position by the adjunction of a palmitoyl-lysylamide group.

LIPO-6T: mixture of five peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284, and Pol 325–355) + TT 830–846 sequence from tetanus toxoid (containing the TT 830–843 HTL epitope), all linked at the C-terminal to a monopalmitic acid via a lysine.

VCP205: recombinant canarypox expressing the HIV proteins Env gp120 (MN strain) associated with the transmembrane portion of gp41 (LA1 strain), the Protease (LA1 strain).

VCP300: recombinant canarypox expressing the HIV proteins Env gp120 (MN strain) associated with the transmembrane portion of gp41 (LA1 strain), the Protease (LA1 strain), and a polypeptide containing several CTL epitopes from Nef and Pol proteins.

VCP1452: recombinant canarypox expressing the HIV proteins Env gp120 (MN strain) associated with the transmembrane portion of gp41 (LA1 strain), the Protease (LA1 strain), and a polypeptide containing several CTL epitopes from Nef and Pol proteins.

MVA-HIV B: recombinant MVA expressing HIV-1 (LA1 strain) Gag, Pol, and Nef protein sequences especially covering those included in LIPO-5.

GTU-Multi-HIV B: DNA vaccine composed of fused HIV-1 (H4N2 strain) coding sequences of Rev, Nef, and Tat (RNT), Gag p17 and p24, and 11 17–45 amino acid long CTL epitopes rich clusters from Pol and Env polypeptides.

QS-21: saponin obtained from *Quilaja saponaria* extract.

NA: not available.

Table 2. Characteristics of ANRS clinical trials evaluating HIV lipopeptide vaccine formulations in HIV-infected patients.

Trial	Clinical phase	Sponsor	Date	Number of subjects	Phase of antiviral treatment initiation	Lipopeptide vaccine (route)	Associated vaccines (route)	Immunization regimen	Associated immunotherapy	CD4 response rate (proliferation assay) <sup>a</sup>	CD8 response rate (IFN-γ ELISpot assay) <sup>b,c</sup>
ANRS LIPATHERA	II	ARV/H ANRS	2000–2005	24	Chronic	LPO-6 (IM)	–	3 × LPO-6	–	74% vs 30%	70% vs 26%
ANRS 093	II	ANRS	2000–2003	71 (divided into two groups)	Chronic	LPO-6T (IM)	VCP1433 (IM)	4 × (LPO-6T + VCP1433)	3 × IL2	58% vs 41% 25% vs 47%	50% <sup>c</sup> 50% <sup>c</sup>
ANRS 095	II	ANRS	2000–2004	43 (divided into three groups)	Primary	LPO-6T (IM)	VCP1433 (IM)	4 × (LPO-6T + VCP1433)	3 × IL2 5 × IL2	23% <sup>c</sup> 21% <sup>c</sup> 15% <sup>c</sup>	53% vs 40% 23% vs 29% 23% vs 36%
ANRS/VR1 DALIA 1	I	BIIR INSERM/ANRS	2008–2011	19	Chronic	LPO-5 loaded on patient's Mo-DCs LPS (SC)	–	4 × LPO-5 loaded on patient's Mo-DCs activated by LPS	–	NA	100% vs 88%
ANRS 149/VR1 02/LIGHT	II	ANRS	2013–2016	105 (divided into two groups)	Chronic	LPO-5 (IM)	GTU-Multi HIV B (IM)	3 × GTU/2 × LPO-5 placebo	–	NA	NA

<sup>a</sup>Response rate after three or four lipopeptide inoculations and evaluated 2–4 weeks after the last lipopeptide injection versus before immunizations.

<sup>b</sup>IFN-γ ELISpot was performed *ex vivo*.

<sup>c</sup>Baseline value, the response was stable and did not differ throughout the trial.

HIV: human immunodeficiency virus; ANRS: France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites; VR1: Vaccine Research Institute; ARV/H: Association de Recherche sur les Virus de l'Immunodéficience Humaine; BIIR: Baylor Institute for Immunology Research; INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; IM: intramuscular; Mo-DCs: monocyte-derived dendritic cells; LPS: lipopolysaccharide; SC: subcutaneous; IL2: interleukin 2. LPO-5: mixture of five peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284, and Pol 325–355) linked at the C-terminal to a monopalmitic acid via a lysine. LPO-6: mixture of six peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 66–97, Nef 117–147, Nef 182–205, Nef 183–214, and Gag 253–284, Env 303–335) and modified in C-terminal position by the adjunction of a palmitoyl-lysylamide group.

LPO-6T: mixture of five peptide sequences derived from HIV-1 LAI (Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284, and Pol 325–355) + TT 830–846 sequence from tetanus toxoid (containing the TT 830–843 HTL epitope), all linked at the C-terminal to a monopalmitic acid via a lysine.

VCP1433: recombinant canarypox expressing the HIV proteins Env gp120 (MN strain) associated with the transmembrane portion of gp41 (LA strain), Gag (LA strain), the Protease (LA strain) and a polypeptide containing several CTL epitopes from Nef and Pol proteins.

GTU-Multi-HIV B: DNA vaccine composed of fused HIV-1 (HIV-1) coding sequences of Rev, Nef, and Tat (RNT), Gag p17, and p24, and 11 17–45 amino acid long CTL epitopes rich clusters from Pol and Env polypeptides. NA: not available.

to induce HLA-DR-restricted Nef-specific IL-2/IFN $\gamma$ -secreting CD4<sup>+</sup> T cells in some volunteers who received a fifth injection of the same vaccine (*ANRS VAC09bis*) [102]. In another prophylactic trial (*ANRS VAC09*), LIPO-6 was injected as a booster immunization in 23 healthy volunteers who had previously received recombinant canarypox viruses (ALVAC) expressing the HIV-1 proteins Env (gp120), Gag, Protease and some CTL domains of Pol and Nef proteins (*ANRS VAC03* and *ANRS VAC07* trials). After 3–5 injections of vCP205 or vCP300 ALVAC, a booster effect of the lipopeptides was observed. Even if the lipopeptide-based vaccine was developed to induce CTL responses, B cell responses were observed against different peptidic sequences included in the LIPO-6 [99]. In view of these promising results, the ANRS decided to pursue phase I and II vaccine trials in healthy volunteers using lipopeptides. However, since no antibody response was observed against Nef 182–205 and Gag 183–214 peptides, these sequences were eliminated for the next lipopeptide constructs.

*LIPO-4*, a new formulation of lipopeptide was then developed. This vaccine was composed of Gag 77–85, Pol-RT 342–354, Pol 476–484, and Nef 62–82 peptidic sequences from HIV-1 LAI. Each peptide was colinearly associated with the HTL epitope TT 830–843 which was linked at the N-terminus to a monopalmitic acid via a lysine [103]. This lipopeptide vaccine was tested in two prophylactic clinical trials in humans (*ANRS VAC12* and *ANRS VAC16*). In the *ANRS VAC16* trial, LIPO-4 was injected in 68 healthy volunteers at week 0, 4 and 12 either by the i.m. (500  $\mu$ g of each lipopeptide) or intradermal (i.d.) route (100  $\mu$ g of each lipopeptide). No severe, serious or life-threatening adverse events were observed. Local pain was significantly more frequent after i.m. injection but local inflammatory reactions were more frequent after i.d. immunization. At week 24, there was a trend to higher CD8<sup>+</sup> T cell (31% vs 21%) and lower CD4<sup>+</sup> T cell (48% vs 71%) responses after i.d. compared to i.m. immunization, respectively [103]. After long-term follow-up (W48) a striking change in the specificity of the CD8<sup>+</sup> T cell responses was observed in both arms in comparison to week 24, highlighting the importance of long-term immunomonitoring for assessment of all memory cells induced after vaccination [104]. Globally, this study demonstrated that 500  $\mu$ g of LIPO-4 administered by i.m. route and 100  $\mu$ g of the same vaccine injected i.d. were similar in terms of immunogenicity for the induction and maintenance of CD8<sup>+</sup> T cell responses. The lowest i.d. dose induced and maintained CD4<sup>+</sup> T cell responses, but to a lesser degree than the highest dose injected by the i.m. route.

To date, the most studied lipopeptide formulation developed by the ANRS is *LIPO-5*. This vaccine candidate is composed of HIV-1 LAI Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284, and Pol 325–355 peptidic sequences linked at the C-terminus to a monopalmitic acid via a lysine [61]. This lipopeptide mixture was tested in different prophylactic HIV-1 vaccine trials either alone or in combination with viral recombinant or DNA plasmid vectors. In the *ANRS VAC10* and *ANRS VAC17* trials, LIPO-5 was injected alone or co-administered either with the tetanus toxoid lipopeptide TT 830–846 sequence containing a promiscuous HTL epitope

(*LIPO-6T*), or with a recombinant canarypox expressing the HIV-1 MN strain protein gp120 associated with HIV-1 LAI strain proteins gp41, Gag, Pol and a polypeptide containing several CTL epitopes from Nef and Pol proteins (ALVAC vCP1452). In view of the results (unpublished), the ANRS decided to start a phase II trial using LIPO-5 injected alone in healthy volunteers in France (*ANRS VAC18*) and collaborated with the HIV vaccine trial network (HVTN) in the USA for a phase I/II trial involving vCP1452 and LIPO-5 in a prime-boost study design (*HVTN042/ANRS VAC19*). The HVTN042/*ANRS VAC19* protocol was to immunize 174 volunteers 4 times with either vCP1452 alone, LIPO-5 alone, or 2 primes of vCP1452 followed by 2 boosts of LIPO-5 at different doses. However, vaccinations were halted due to safety concerns raised by one case of myelitis possibly related to LIPO-5 vaccine. A rigorous clinical evaluation did not reveal an alternative etiology for the myelitis. Prior to the trial suspension, 174 (100%), 168 (97%), 142 (82%), and 73 (42%) of the subjects received injections at months 0, 1, 3, and 6, respectively. Nonetheless, antibody (p24 and gp120 HIV-1 proteins ELISA on sera) and CD8<sup>+</sup> T cell (*ex vivo* IFN $\gamma$  ELISpot on PBMC) responses were evaluated two weeks after the last injection. ALVAC-HIV (vCP1452) was shown to elicit modest levels of anti-HIV-1 antibodies which did not increase after administration of LIPO-5. Moreover, there was no evidence that vaccine regimens induced positive *ex vivo* IFN $\gamma$  ELISpot responses [105]. These negative results were not confirmed by the *ANRS VAC18*, where three different doses (500, 150, and 50  $\mu$ g of each lipopeptide) of the LIPO-5 vaccine or placebo injected 4 times (weeks 0, 4, 12, and 24) intramuscularly to 132 healthy volunteers. LIPO-5 was well tolerated with local reactions that were dose-dependent, but no difference in systemic reactions appeared between groups. Importantly, no grade 4 systemic event was seen in any of the groups. After 2 immunizations (week 6), more than 60% of the vaccinated subjects developed CD8<sup>+</sup> T cell responses detected by a cultured IFN $\gamma$  ELISpot assay [61]. Interestingly, this one step stimulation ELISpot technique is known to preferentially detect memory T cells correlated with protection against malaria [106]. These responses in the *ANRS VAC18* trial were still present for about 50% of the vaccinated subjects six months after the last vaccination (week 48). Globally, 32% of the LIPO-5 recipients developed responses to at least two of the five HIV-1 regions included in the vaccine. Concerning the CD4<sup>+</sup> T cell responses, they were detected in about 30% of the vaccinees after 3 immunizations (week 14), but were detected in only 15% of vaccinees at week 48. The Gag 253–284 region was the most immunogenic but all five peptide sequences were able to induce CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell responses. The three doses of LIPO-5 tested in this study showed the same efficiency for inducing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses and globally equivalent specificities were recognized by stimulated T cells. Moreover, Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) and Th2 (IL-5, IL-13) cytokine responses were observed in cultured multiplex assays and canonical pathway analyses indicated a role of interferon signaling genes in response to LIPO-5 after transcriptomic analyses [107]. Together with the absence of significant responses in *ex vivo* assays, these findings suggested that vaccination by LIPO-5 induced memory precursors, but not effector cells, capable of expanding under antigenic stimulation. The latest

prophylactic clinical trial using LIPO-5 was ANRS VRI01. This phase I/II clinical trial compared four different prime-boost combinations: 2 x MVA HIV-B/2 x LIPO-5, 2 x LIPO-5/2 x MVA HIV-B, 3 x GTU- multiHIV B/2 x LIPO-5, 3 x GTU- multiHIV B/2 x MVA-B [108]. MVA HIV-B contained Gag, Pol and Nef protein sequences from HIV-1 LAI (clade B), especially covering those included in LIPO-5 [109]. GTU- multiHIV B is a DNA vaccine composed of fused HIV-1 HAN2 (clade B) coding sequences of Rev, Nef, and Tat (RNT), Gag p17 and p24, and 11 17–45 aa long CTL epitope-rich clusters from the Pol and Env polypeptides [110]. All vaccines were injected i.m. to 92 healthy volunteers. This trial ended in November 2016 and the first data will be presented at the IAS meeting in 2017 [111].

### 2.5.2. Lipopeptide formulations evaluated in HIV-infected patients

The first HIV-1 therapeutic trial was performed by Letvin's group in 2000 using lipopeptides in 6 HIV-1 seropositive patients with CD4<sup>+</sup> lymphocytes counts >500/ $\mu$ l of blood without any previous antiviral therapy [112]. This lipopeptide vaccine consisted of HIV-1 Gag 253–284 sequence linked to a P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> lipid moiety and was administered 3 times (weeks 0, 28, and 56) by the s.c. route at a dose of 350  $\mu$ g. After vaccinations, PBMCs from two of the four HLA-selected subjects who received the experimental immunogen showed a transient increase in Gag peptide-specific bulk CTL activity. However, no consistent decrease in plasma HIV-1 RNA levels was noted in any of the subjects.

LIPO-6 was also used as an HIV-1 therapeutic candidate vaccine in the LIPATHERA trial. This trial evaluated lipopeptide immunogenicity in 24 HIV-1-infected patients on highly active antiretroviral therapy (HAART) and examined if lipopeptide immunization could permit long-term structured treatment interruption (STI). The vaccination schedule consisted of 3 immunizations (weeks 0, 3, and 6) with 500  $\mu$ g of each lipopeptide. First, this study showed that lipopeptide vaccination of HAART-treated patients could induce new CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses not detected before immunizations [113]. Some of the new CD8<sup>+</sup> T cell responses were also observed in vaccinated healthy individuals and suggested that T cell epitopes induced by LIPO-6 vaccination could be different from those observed in HIV-1-infected individuals. This might have important implications for HIV-1 immunotherapy. Second, this study demonstrated that a significant percentage (38%) of chronically HIV-1 infected patients could remain off HAART for a long period (from week 24 to week 96) after the LIPO-6 vaccination [114].

LIPO-6T was used as an HIV-1 therapeutic candidate vaccine in two different clinical trials. ANRS 093 was a randomized multicentric trial where four i.m. injections (weeks 0, 4, 8, 12) of LIPO-6T associated with ALVAC-HIV vCP1433 (containing the same HIV-1 inserts as vCP1452 used in the ANRS VAC10 trial) followed by three s.c. IL-2 cycles (five days each) were given to 33 HIV-infected patients on HAART to examine if lipopeptide immunization permits long-term STI. Patients who received the vaccine (Vac-IL-2 vaccine) or placebo stopped antiviral drugs at week 40. A stable HIV-1 p24 antigen proliferative response was found in 47% of the Vac-IL-2 group

compared with 24% in the placebo group. Moreover, after lipopeptide vaccination, 58% of the Vac-IL-2 group exhibited a multiepitopic HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cell proliferative response compared with 25% of the controls. The breadth and the magnitude of HIV-1-specific IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells improved in the Vac-IL-2 group. After stopping antiviral drugs, 24% of the Vac-IL-2 group lowered their viral set point (defined as the percentage of individuals who maintained plasma HIV RNA below 10,000 copies/ml) compared with 5% in the placebo group. Logistic regression analysis demonstrated that vaccine-elicited immunological responses were predictive of virological control [115]. In a long-term follow-up that extended from week 52 to week 100, the median cumulative time off-treatment was greater in the Vac-IL-2 group (177 days) than in the control group (89 days). Median viremia at 4 weeks following the first, second and third STI was higher in controls (4.81, 4.44, 4.53 log<sub>10</sub> copies/ml) compared to vaccinated patients (4.48, 4.00, 3.66 log<sub>10</sub> copies/ml). Finally, HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses strongly correlated with the reduction of antiviral therapy duration [116]. These findings provided evidence that Vac-IL-2 therapeutic vaccine significantly impacts upon HIV-1 replication. ANRS 095 used the same vaccine design as ANRS 093 trial (Vac-IL-2) but all patients included in this study were treated with HAART during primary HIV-1 infection, and an additional group of subjects received only five cycles of subcutaneous IL-2 (at weeks 0, 8, 16, 24, and 32). The same STI as ANRS 093 were realized but the results were divergent. Indeed, HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses did not change in immunized patients relative to controls, and vaccination had only a transient effect on IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cell responses. Viral rebound after treatment interruption was similar in immunized patients and controls. The cumulative time off treatment did not differ between groups and represented almost half the total follow-up period from week 40 to week 100. This study concluded that STI was safe in patients treated early after primary HIV-1 infection and that immunization with LIPO-6T and interleukin-2 appeared to have no supplementary benefit for these patients [117]. A higher proportion of sustained anti-p24 antigen responses was observed after immune intervention in Vac-IL-2 than in control group in ANRS-093 patients treated during chronic infection ( $p = 0.049$ ). The same trend was also observed with ANRS-095 patients treated in acute infection but did not reach statistical significance ( $p = 0.06$ ), probably due to a limited number of patients. Indeed, 33 patients were included in Vac-IL-2 group for ANRS-093 trial while only 12 patients were included for this group in ANRS-095 trial. In contrast to ANRS-093, no difference was observed in term of virological success or time to virological failure between control and Vac-IL-2 groups in ANRS-095 trial. In fact, these two parameters were higher in controls from ANRS-095 than ANRS-093 patients. This could be explained by a lower HIV-1 reservoir (as measured by HIV DNA) in ANRS-095 than ANRS-093 patients. Moreover, it is known that early initiation of HAART preserve B and T cell functions [118,119]. Thus we can speculate that the better immunological status of ANRS-095 patients could have masked the moderate effect of the vaccine.

LIPO-5 was recently used in ANRS 149/VRI02/LIGHT, a phase II HIV-1 therapeutic clinical trial where 105 HIV-1-infected patients under HAART were vaccinated using GTU-MultiHIV-B/LIPO-5 as a prime/boost vaccine strategy. After 3 i.m. DNA immunizations (weeks 0, 4, 12), patients received two i.m. LIPO-5 boosts (weeks 20 and 24) and antiretroviral treatment was stopped between week 36 and 48. The vaccine was well-tolerated. Immunogenicity and virologic efficacy analyses are currently under way.

### 2.6. Other HIV-1 peptide-based vaccine approaches

Lipopeptides are not the only approach for peptide-based vaccines against HIV. Indeed, other groups have developed adjuvanted peptidic formulations. A multicenter phase II peptide-based therapeutic vaccine trial for HIV-1 (Vacc-4x) using four Gag p24 peptides modified by aminoacid substitution to improve antigen processing and presentation on diverse HLAs was conducted between 2008 and 2010 [120]. This vaccine was injected i.d. (1.2 mg) and adjuvanted with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The proportion of patients resuming cART before the end of the study and change in CD4 counts during antiretroviral treatment interruption (ATI) showed no benefit of vaccination. However, Vacc-4x was immunogenic and seemed to contribute to a viral load setpoint reduction after ATI. Interestingly, two of the four peptides used in this vaccine candidate correspond to the Gag 253–284 sequence included in the LIPO-5 vaccine. Another common adjuvant used with peptidic formulations is the Montanide ISA-51 composed of light mineral oil and surfactant and designed to form water-in-oil emulsion. This adjuvant was used with HIV-v, a mixture of four multi-epitope polypeptides in a phase Ib HIV therapeutic vaccine trial [121]. Vaccine sequences were coming from HIV Vpr, Vif, Rev and Nef proteins. Even if this adjuvanted vaccine injected s.c. had no effect on CD4 counts, it elicited IgG responses in up to 75% of participants and the high adjuvanted dose (0.5 mg) elicited cellular responses in 45% of the patients. Moreover, in these B and T cell responding subjects, viral loads were reduced by over 1 log compared to placebo and non-responders. Interestingly, a part of the Nef sequence included in this vaccine can also be found in LIPO-5. Another promising HIV-1 T-cell vaccine is called HIVconsv and was derived from the 14 most conserved regions of the HIV-1 proteome. It was evaluated in NHPs and humans using different vaccine modalities. Administration of conserved immunogen vaccines in human volunteers by a potent simian adenovirus prime-MVA boost regimens induced robust CD8<sup>+</sup> T cell responses capable of broad HIV-1 inhibition *in vitro* [122]. After s.c. injection of the 46 synthetic long peptide vaccine modality (0.3 mg each adjuvanted by topical imiquimod and montanide ISA-51 emulsification) into six anatomically separate sites in macaques, induction of both T cells and antibodies to conserved region of HIV-1 was observed [123]. Last but not least, other groups are working on « signal » sequences able to increase epitope processing and presentation to CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes for T cell based vaccines. In mouse model, Reguzova and colleagues showed that adding N-terminal ubiquitin to DNA

polyepitope immunogen to target proteasome improved immunogenicity of the construct [124].

### 2.7. From vaccination with lipopeptide constructs to dendritic-based vaccines

Another approach for therapeutic vaccination explored during the last few years is the administration of autologous monocyte-derived DCs (Mo-DCs) loaded *ex vivo* with a variety of inactivated pathogens and tumor antigens. This vaccine strategy, that relies on the key property of DCs to be the most effective APCs and coordinators of the immune response [1], has been shown to induce a potent protective immunity in experimental murine models as well as in cancer patients [125] and is actually tested by different groups in HIV-infected patients [126]. After demonstrating that monocytes isolated from HIV-1-infected patients, when differentiated into DCs (Mo-DCs) using GM-CSF and IFN $\alpha$  and pulsed with HIV-1 peptides were potent inducers of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro* [127], a HIV-1 lipopeptide antigen-pulsed therapeutic DC vaccine was developed with ANRS support [128]. Thanks to collaboration between the Baylor Institute for Immunology Research (BIIIR), the ANRS and the Vaccine Research Institute (VRI), this *ex vivo* DC vaccine was then tested in humans.

ANRS/VRI DALIA 1 was a phase I HIV-1 therapeutic trial realized in 19 HIV-1 infected patients on HAART. Participants received four s.c. injections in three separate injection sites in the upper and lower extremities at week 0, 4, 8, and 12. The vaccine consisted of patient-derived GM-CSF and IFN $\alpha$  matured Mo-DCs pulsed with LIPO-5 and then activated *in vitro* by LPS [128]. Vaccination increased: (i) the breadth of the immune response from 1 to 4 peptide-pool responses/patient; (ii) the frequency of functional T cells (producing at least two cytokines among IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , and IL-2) from 0.026% to 0.32% and from 0.26% to 0.35% for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, respectively; and (iii) the breadth of cytokines secreted by PBMCs upon antigen exposure, including IL-2, IFN $\gamma$ , IL-21, IL-17, and IL-13. Following ATI, 50% of patients experienced a maximum of viral load (VL) 1 log<sub>10</sub> lower than the other 50%. An inverse correlation was found between the maximum of VL and the frequency of polyfunctional CD4<sup>+</sup> T cells, production of IL-2, IFN $\gamma$ , IL-21, and IL-13. These results suggest an association between vaccine responses and improved control of viral replication [129]. Moreover, it was recently shown that this therapeutic vaccination skewed the HIV-1-specific response from regulatory to effector T cell phenotype that impacted on the magnitude of viral replication following ATI [130]. Taken together, these results underscored the role of *ex vivo* DC pulsed with LIPO-5 in therapeutic vaccination for improving immune status against HIV-1 by eliciting broad polyfunctional T cell responses.

Last but not least, DC manipulation can be achieved directly *in vivo*. Indeed, antigens can be targeted efficiently and specifically to DCs using monoclonal antibodies directed against cell-surface receptors [131]. The Inserm/VRI has patented compositions, methods for the expression, secretion and use of novel recombinant humanized antibodies against a panel of human DC receptors: DCIR, LOX-1, Langerin and CD40 fused to either the same HIV-1 peptides as in LIPO-5, but

without the lipid tail (HIV5pep), or Env gp140 for therapeutic and prophylactic vaccines, respectively. Results obtained *in vitro* and in NHPs showed that anti-DCIR, anti-LOX-1 and anti-CD40 vaccines induced strong cellular and humoral responses when administered with adjuvant (Poly ICLC or GLA) to naïve macaques or animals primed with ANRS-MVA-HIV-B or poxvirus (NYVAC) [132–135]. The therapeutic anti-CD40.HIV5pep [136] and prophylactic anti-CD40.Env gp140 vaccine candidates coadministered with poly ICLC were selected for clinical development in phase I/II clinical trials and these anti-CD40 constructs are actually in the GMP-production phase.

### 3. Conclusion

In the view of the importance of CTL in controlling viral infections, peptide-based vaccines were developed in the late 1980s. The poor immunogenicity of these initial preparations was improved after the identification and the synthesis of the factors responsible for the efficiency of Freund's adjuvants. Bacterial lipopeptides (Pam<sub>3</sub>Cys and Pam<sub>2</sub>Cys) were shown to act as potent adjuvants thanks to their ability to activate TLR-2 on APCs. Thus, various different types of lipopeptides have been and are still developed and used as vaccine candidate against different human pathogens and cancers. Interestingly, the addition of a simple lipid moiety like palmitic acid to peptides was also shown to activate DCs TLR-2 and to induce Th1-dependent immunity. This monopalmitoylated approach has unique advantages in terms of simplicity of production and therefore on purity and cost. Moreover, it avoids the use of toxic adjuvants. This approach, particularly developed as an HIV-1 vaccine candidate, allows tailoring and selecting immunogens that could provide an advantage in terms of specificity of the elicited immune responses. More recently, the experience in HIV-1 lipopeptide vaccine development made possible the use of LIPO-5 as a part of an *ex vivo* DC-based vaccine and HIV5pep to target DC *in vivo* for future anti-HIV vaccine trials in humans.

To the exception of the recent RV144 trial, which elicited a modest level (31.2%) of protection against infection [137], no candidate has shown efficacy in preventing HIV-1 infection in humans. So despite three decades effort of scientific community on preventive and therapeutic vaccines/immunotherapy against HIV, no effective one is so far available. A few CTL-based vaccines have already been tested in efficacy phase IIb/III trials in humans and failed (STEP, Phambili and HVTN 505). The failure of the Phase IIb clinical trial (known as STEP trial) of the Merck Adeno5 vaccine candidate has questioned the validity of the T cell vaccine strategy. This test-of-concept study evaluated a strategy comprising three injections of MRKAd5 HIV-1 Gag/Pol/Nef vaccine. Despite a rate of 41% CD4<sup>+</sup> T cell responders (identified by intracellular cytokine staining) and 77% CD8<sup>+</sup> T cell responders (identified by *ex vivo* IFN $\gamma$  ELISpot) this vaccine showed no protection against HIV-1 acquisition [138]. There are however major substantial differences between the Merck and the other vaccine platforms under advanced clinical development: (1) the Merck vaccine did not have the DNA priming component (homologous prime/boost),

(2) it did not include envelope, and (3) the heterologous (DNA/Ad5 or DNA/NYVAC) and not the homologous (Ad5) prime/boost regimens were associated with better attenuation of viral load in monkeys challenged with the highly pathogenic SIVmac239. However, the HVTN 505 regimen (DNA/rAd5 vaccine administered in circumcised, Ad5-seronegative men and transgender women who have sex with men) that responds to these pitfalls was associated with the same disappointing lack of efficacy. Indeed, the vaccine showed no significant effect on HIV-1 infection even though it was immunogenic: among 40 vaccine recipients who remained HIV-1 uninfected, 100% generated IgG-binding antibodies to the vaccine strain envelopes, and 62% and 64% generated HIV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses, respectively [139]. The choice of Env as part of a T cell vaccine has been often challenged as anti-Env CD8<sup>+</sup> T cells were not associated with viral control. However recent data seem to show a strong inverse correlation between Env-specific CD8<sup>+</sup> immune response magnitude and HIV-1 infection risk when comparing HIV-infected and non-infected vaccinees in HVTN 505 trial [139]. In this study HIV-1 acquisition was also negatively correlated with the polyfunctionality of these Env CD8<sup>+</sup> T cell responses. Therefore, beside new non classical T cell based vaccines [140], there is still a place for other T cell approaches. Clinical trials have shown that immune responses induced by HIV-1 lipopeptides are probably too weak to go on with these vaccines as a unique strategy. However, results from the DALIA-1 trial provided evidences that peptide-based vaccines still have a place among therapeutic HIV-1 vaccine strategies.

### 4. Expert commentary

An important point for developing vaccines to be used in humans is the safety of the product. In a meta-analysis covering more than 200 vaccinated subjects, lipopeptides developed by the ANRS have been shown to be safe and well tolerated both in healthy volunteers and HIV-infected patients [141]. These lipopeptide formulations inoculated intramuscularly or intradermally were shown to be immunogenic. As sexual intercourse is the most common risk factor for HIV-1 transmission, and the genital and rectal mucosae are major HIV-1 entry sites, it should be interesting to test mucosal vaccination with HIV-1 lipopeptides. In the past, the ANRS VAC14 study showed that a mucosal HIV-1 vaccine (recombinant gp160MN/LAI-2) could be well tolerated when administered by nasal or vaginal routes [142]. Moreover, lipopeptides delivered intranasally were shown to be immunogenic in mice for CMV [143] and Influenza [144] models. Indeed, a move to mucosal application of lipopeptide vaccines rather than use of standard parental injections would be advantageous from logistical, economic, and safety standpoints [145]. Moreover, in the case of HIV-1, a vaccine able to establish immunity at mucosal sites could prevent the dissemination and replication of the virus. Recently, a prime/boost vaccine targeting the genital tract, using a lipopeptide construct containing three palmitic acids as priming and a recombinant Adenovirus 5 vaccine for boosting, induced potent and long-lasting CD8<sup>+</sup> T cell protective immunity against genital herpes infection and disease in mice [146].

Since the polyfunctionality of memory CD8<sup>+</sup> T cells elicited by lipopeptide vaccines developed by the ANRS seemed to be improved [147] and considering the last generation of lipopeptide constructs, new formulations, like promising branched lipopeptides, could be tested as HIV-1 vaccine candidates [148]. Another way to improve vaccine immunogenicity is to target DCs directly. For this purpose, the VRI has developed two new vaccine concept platforms based on the manipulation of DCs either *ex vivo* (DALIA platform) or *in vivo* (CD40 antibody platform). In fact, there is a general consensus in the field for changing the paradigm of immune interventions in HIV-1 and the need of: (i) innovative strategies switching the empirical conceptual approach for vaccine development to strategies based on the best knowledge in basic sciences; (ii) innovation in vaccine production; and (iii) strategies combining vaccines and immune interventions. Based on data generated in preclinical models or in phase I trials, (i) DC-based vaccines should generate strong and broad T cell responses against HIV-1, (ii) the future combination with IL-7 cytokine as an HIV-1 mobilizer from hidden HIV-1 reservoirs and as vaccine adjuvant should improve vaccine-elicited immune responses and/or mobilize the HIV-1 reservoir, and (iii) the use of broad neutralizing antibodies (bNabs) should potentiate the impact of co-administered vaccines through a direct antiviral potency and a 'vaccine like effect'. We think that innovation in clinical trial design [108] will allow acceleration of development of best-in-class strategies and we surmise here that analysis, integration and mathematical modeling of the generated (big) data may help in understanding the mechanism of action of the vaccines ('vaccine signatures') and correlates of protection, but also in predicting the response to new vaccine strategies.

### 5. Five-year view

The quest for efficacious HIV-1 vaccines will certainly be escalating in the next few years. LIPO-5 was actually tested in one prophylactic (ANRS/VRI01) and one therapeutic (ANRS 149/VRI02/LIGHT) HIV-1 vaccine clinical trial. Analyses of these two studies are ongoing and the future of the lipopeptide strategy launched by the ANRS in early 1990s will largely depend on the success of these two trials. If the prophylactic study confirms the pre-clinical results observed in macaques, LIPO-5 could be used as a prime for future prime/boost vaccines involving rMVA or other recombinant viral vectors, thus avoiding the anti-vector responses observed after several injections. LIPO-5 could be used also in combination with vaccine candidates aiming to elicit B cell responses against Env. After the transfer of the promising DALIA vaccine technology from BIIR (USA) to the VRI (France), a second therapeutic DALIA trial will start in 2017 using Mo-DCs pulsed *ex vivo* with LIPO-5 and activated by LPS, but with the addition of co-administered of IL-7. Combination of DALIA vaccine with passive immunization using bNabs is also being planned. Considering *in vivo* DC targeting, the prophylactic anti-CD40. Env gp140 and the therapeutic anti-CD40.HIV5pep co-administered with poly ICLC will soon be tested for the first time in humans. A prime-boost combination of anti-CD40.HIV5pep

and ANRS-MVA-HIV-B vector should also be launched by the VRI within the next 5 years.

### Key issues

- Simple lipopeptide constructs do not need the use of adjuvant to induce CTL *in vivo*
- Monopalmitoylated lipopeptide immunogenicity relies on the covalent association between the peptide and the lipid moiety
- Monopalmitoylated lipopeptides stimulate DCs through the TLR2 pathway, leading to a strong Th1 response
- CTL lipopeptide vaccines need to contain several CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell epitopes from the most conserved regions of HIV-1 in order to protect individuals irrespective of their MHC class I and MHC class II haplotypes and to avoid the risk of failure through HIV-1 escape mutants
- Lipopeptide vaccines based on clade B HIV-1 can induce cross-clade CD8<sup>+</sup> T cell responses
- Even if HIV-1 lipopeptide-based vaccines were developed to induce CTL responses, antibodies directed to the vaccine inserts can be elicited
- LIPO-5 induces memory precursors and can be used as a prime for prophylactic HIV-1 vaccines
- Therapeutic HIV-1 vaccines using lipopeptides induce new T cell responses that are predictive of virological control in HIV-1-seropositive patients
- Monocytes isolated from HIV-1-infected patients, differentiated into DCs using GM-CSF and IFN $\alpha$  and pulsed with LIPO-5 (DALIA *ex vivo* DC-based vaccine) were potent inducers of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell responses
- LIPO-5 sequences were selected as an antigen of choice (HIV5pep) to target DCs *in vivo* for future anti-HIV vaccine trials in humans using DC-targeting technology

### Funding

This work was supported by the Investissements d'Avenir program managed by the ANR [ANR-10-LABX-77-01].

### Declaration of interest

Y Lévy and G Zurawski are inventors on a patent applications related to the *in vivo* DC-targeting described in this review. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

### References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Banchereau J, Steinmann RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245–252.
2. Engelhard VH. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(1):13–23.
3. Röttschke O, Falk K. Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr Opin Immunol*. 1994;6(1):45–51.

4. Weiss RA, Clapham PR, Cheingsong-Popov R, et al. Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature*. 1985;316(6023):69–72.
5. Lyerly HK, Reed DL, Matthews TJ, et al. Anti-GP 120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1987;3(4):409–422.
6. Berman PW, Gregory TJ, Riddle L, et al. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature*. 1990;345(6276):622–625.
7. Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis*. 1996;173(2):340–348.
8. Wong-Staal F, Shaw GM, Hahn BH, et al. Genomic diversity of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science*. 1985;229(4715):759–762.
9. Robert-Guroff M, Reitz MS Jr, Robey WG, et al. In vitro generation of an HTLV-III variant by neutralizing antibody. *J Immunol*. 1986;137:3306–3309.
10. Berman PW, Groopman JE, Gregory T, et al. Human immunodeficiency virus type 1 challenge of chimpanzees immunized with recombinant envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5200–5204.
11. Zinkernagel RM, Welsh RM. H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J Immunol*. 1976;117(5 Pt 1):1495–1502.
12. Baba TW, Liska V, Khimani AH, et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med*. 1999;5(2):194–203.
13. Johnson JA, Barouch DH, Baden LR. Nonreplicating vectors in HIV vaccines. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;8(5):412–420.
14. Parks CL, Picker LJ, King CR. Development of replication-competent viral vectors for HIV vaccine delivery. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013;8(5):402–411.
15. Ramirez LA, Arango T, Boyer J. Therapeutic and prophylactic DNA vaccines for HIV-1. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(4):563–573.
16. Townsend AR, Rothbard J, Gotch FM, et al. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*. 1986;44(6):959–968.
17. Aichele P, Hengartner H, Zinkernagel RM, et al. Antiviral cytotoxic T cell response induced by in vivo priming with a free synthetic peptide. *J Exp Med*. 1990;171(5):1815–1820.
18. Hart MK, Weinhold KJ, Searce RM, et al. Priming of anti-human immunodeficiency virus (HIV) CD8+ cytotoxic T cells in vivo by carrier-free HIV synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(21):9448–9452.
19. Schulz M, Zinkernagel RM, Hengartner H. Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(3):991–993.
20. Wm K, Roux L, Curren J, et al. Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(6):2283–2287.
21. Melchers F, Braun V, Galanos C. The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *J Exp Med*. 1975;142(2):473–482.
22. Johnson RB, Köhl S, Wiesmüller K, et al. Synthetic analogues of the N-terminal lipid part of bacterial lipoprotein are B-lymphocyte mitogens in vitro and in vivo. *Immunobiology*. 1983;165(1):27–35.
23. Hoffmann P, Heinle S, Schade UF, et al. Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology*. 1988;177(2):158–170.
24. Wiesmüller KH, Jung G, Hess G. Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine*. 1989;7(1):29–33.
25. Deres K, Schild H, Wiesmüller KH, et al. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature*. 1989;342(6249):561–564.
- **First lipopeptide vaccine inducing CTL *in vivo*.**
26. Zeng W, Ghosh S, Lau YF, et al. Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuncting immun contraceptive vaccines. *J Immunol*. 2002;169(9):4905–4912.
27. Jackson DC, Lau YF, Le T, et al. A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15440–15445.
28. Coon J, Hunter R. Selective induction of delayed hypersensitivity by a lipid conjugated protein antigen which is localized in thymus dependent lymphoid tissue. *J Immunol*. 1973;110(1):183–190.
29. Dailey MO, Post W, Hunter RL. Induction of cell-mediated immunity to chemically modified antigens in guinea pigs. II. The interaction between lipid-conjugated antigens, macrophages, and T lymphocytes. *J Immunol*. 1977;118(3):963–970.
30. Hopp TP. Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Mol Immunol*. 1984;21(1):13–16.
31. Robinson JH, Case MC, Brooks CG. Palmitic acid conjugation of a protein antigen enhances major histocompatibility complex class II-restricted presentation to T cells. *Immunology*. 1992;76(4):593–598.
32. Uhl B, Wolf B, Schwinde A, et al. Intracellular localization of a lipopeptide macrophage activator: immunocytochemical investigations and EELS analysis on ultrathin cryosections of bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol*. 1991;50(1):10–18.
33. Schild H, Deres K, Wiesmüller KH, et al. Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur J Immunol*. 1991;21(11):2649–2654.
34. Faló LD Jr, Colarusso LJ, Benacerraf B, et al. Serum proteases alter the antigenicity of peptides presented by class I major histocompatibility complex molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):8347–8350.
35. Rouaix F, Gras-Masse H, Mazingue C, et al. Effect of a lipopeptidic formulation on macrophage activation and peptide presentation to T cells. *Vaccine*. 1994;12(13):1209–1214.
- **Critical role of covalent association between the peptide and the lipid moiety for monopalmitoyled lipopeptide immunogenicity.**
36. Tsunoda I, Sette A, Fujinami RS, et al. Lipopeptide particles as the immunologically active component of CTL inducing vaccines. *Vaccine*. 1999;17(7–8):675–685.
37. Loing E, Andrieu M, Thiam K, et al. Extension of HLA-A\*0201-restricted minimal epitope by N epsilon-palmitoyl-lysine increases the life span of functional presentation to cytotoxic T cells. *J Immunol*. 2000;164(2):900–907.
38. Andrieu M, Loing E, Desoutter JF, et al. Endocytosis of an HIV-derived lipopeptide into human dendritic cells followed by class I-restricted CD8(+) T lymphocyte activation. *Eur J Immunol*. 2000;30(11):3256–3265.
39. Andrieu M, Desoutter JF, Loing E, et al. Two human immunodeficiency virus vaccinal lipopeptides follow different cross-presentation pathways in human dendritic cells. *J Virol*. 2003;77(2):1564–1570.
40. Seifert U, Marañón C, Shmueli A, et al. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol*. 2003;4(4):375–379.
41. Hoeffel G, Ripoché AC, Matheoud D, et al. Antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2007;27(3):481–492.
42. Song YC, Chou AH, Homhuan A, et al. Presentation of lipopeptide by dendritic cells induces anti-tumor responses via an endocytosis-independent pathway in vivo. *J Leukoc Biol*. 2011;90(2):323–332.
43. Pfender NA, Grosch S, Roussel G, et al. Route of uptake of palmitoylated encephalitogenic peptides of myelin proteolipid protein by antigen-presenting cells: importance of the type of bond between lipid chain and peptide and relevance to autoimmunity. *J Immunol*. 2008;180(3):1398–1404.

44. Stittelaar KJ, Hoogerhout P, Ova W, et al. In vitro processing and presentation of a lipidated cytotoxic T-cell epitope derived from measles virus fusion protein. *Vaccine*. 2001;20(1-2):249-261.
45. Verheul AF, Udhayakumar V, Jue DL, et al. Monopalmitic acid-peptide conjugates induce cytotoxic T cell responses against malarial epitopes: importance of spacer amino acids. *J Immunol Methods*. 1995;182(2):219-226.
46. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397.
47. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-650.
48. Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(10):1573-1582.
49. Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2001;166(4):2444-2450.
50. Zhu X, Ramos TV, Gras-Masse H, et al. Lipopeptide epitopes extended by an N-epsilon-palmitoyl-lysine moiety increase uptake and maturation of dendritic cells through a Toll-like receptor-2 pathway and trigger a Th1-dependent protective immunity. *Eur J Immunol*. 2004;34(11):3102-3114.
- **Demonstration that monopalmitoyled lipopeptides activate DCs through TLR-2.**
51. Martinon F, Gras-Masse H, Boutillon C, et al. Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Immunol*. 1992;149(10):3416-3422.
- **First demonstration that a simple lipopeptide construct could elicit CTL without the use of adjuvant in HIV vaccination.**
52. Bourgault I, Chirat F, Tartar A, et al. Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. Induction in rhesus macaques of Gag- or NEF-specific cytotoxic T lymphocytes by lipopeptides. *J Immunol*. 1994;152(5):2530-2537.
53. Villada IB, Mortara L, Aubertin AM, et al. Positive role of macaque cytotoxic T lymphocytes during SIV infection: decrease of cellular viremia and increase of asymptomatic clinical period. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;19(1):81-87.
54. Sauzet JP, Déprez B, Martinon F, et al. Long-lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimeric-multirestricted lipopeptides. *Vaccine*. 1995;13(14):1339-1345.
- **Proof of concept of the use of multirestricted CTL epitopes in lipopeptide vaccines.**
55. Gras-Masse H. Single-chain lipopeptide vaccines for the induction of virus-specific cytotoxic T cell responses in randomly selected populations. *Mol Immunol*. 2001;38(6):423-431.
56. Deprez B, Sauzet JP, Boutillon C, et al. Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine*. 1996;14(5):375-382.
- **Comparison of different lipopeptide constructs and selection of the palmitoyl-lysine modification for HIV vaccine candidates in humans.**
57. Mortara L, Letourneur F, Gras-Masse H, et al. Selection of virus variants and emergence of virus escape mutants after immunization with an epitope vaccine. *J Virol*. 1998;72(2):1403-1410.
58. Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, et al. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol*. 1989;19(12):2237-2242.
59. Mortara L, Gras-Masse H, Rommens C, et al. Type 1 CD4(+) T-cell help is required for induction of antipeptide multispecific cytotoxic T lymphocytes by a lipopeptidic vaccine in rhesus macaques. *J Virol*. 1999;73(5):4447-4451.
60. Vilefroy P, Letourneur F, Coutsinos Z, et al. SIV escape mutants in rhesus macaques vaccinated with NEF-derived lipopeptides and challenged with pathogenic SIVmac251. *J Virol*. 2006;80(6):365.
61. Salmon-Ceron D, Durier C, Desaint C, et al. Immunogenicity and safety of an HIV-1 lipopeptide vaccine in healthy adults: a phase 2 placebo-controlled ANRS trial. *Aids*. 2010;24(14):2211-2223.
- **First lipopeptide phase II clinical trial in healthy volunteers involving LIPO-5 as a HIV-1 vaccine candidate.**
62. Dereuddre-Bosquet N, Baron ML, Contreras V, et al. HIV specific responses induced in nonhuman primates with ANRS HIV-Lipo-5 vaccine combined with rMVA-HIV prime or boost immunizations. *Vaccine*. 2015;33(20):2354-2359.
63. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 1987;328(6128):345-348.
64. Walker BD, Flexner C, Paradis TJ, et al. HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocytes in infected individuals. *Science*. 1988;240(4848):64-66.
65. Chenciner N, Michel F, Dadaglio G, et al. Multiple subsets of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans and in mice. *Eur J Immunol*. 1989;19(9):1537-1544.
66. Bouillot M, Choppin J, Cornille F, et al. Physical association between MHC class I molecules and immunogenic peptides. *Nature*. 1989;339(6224):473-475.
- **Demonstration of a physical association between MHC class I molecules and antigenic peptides.**
67. Choppin J, Martinon F, Gomard E, et al. Analysis of physical interactions between peptides and HLA molecules and application to the detection of human immunodeficiency virus 1 antigenic peptides. *J Exp Med*. 1990;172(3):889-899.
68. Choppin J, Martinon F, Connan F, et al. HLA-binding regions of HIV-1 proteins. I. Detection of seven HLA binding regions in the HIV-1 Nef protein. *J Immunol*. 1991;147(2):569-574.
69. Choppin J, Martinon F, Connan F, et al. HLA-binding regions of HIV-1 proteins. II. A systematic study of viral proteins. *J Immunol*. 1991;147(2):575-583.
70. Culmann-Penciolelli B, Lamhamedi-Cherradi S, Couillin I, et al. Identification of multirestricted immunodominant regions recognized by cytolytic T lymphocytes in the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J Virol*. 1994;68(11):7336-7343.
71. Couillin I, Culmann-Penciolelli B, Gomard E, et al. Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein. *J Exp Med*. 1994;180(3):1129-1134.
72. Buseyne F, McChesney M, Porrot F, et al. Gag-specific cytotoxic T lymphocytes from human immunodeficiency virus 1-infected individuals: gag epitopes are clustered in three regions of the p24gag protein. *J Virol*. 1993;67(2):694-702.
73. Choppin J, Cohen W, Bianco A, et al. Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation. *J Immunol*. 2001;166(10):6164-6169.
74. Nixon DF, Townsend AR, Elvin JG, et al. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature*. 1988;336(6198):484-487.
75. Wahren B, Rosen J, Sandström E, et al. HIV-1 peptides induce a proliferative response in lymphocytes from infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1989;2(5):448-456.
76. Johnson RP, Trocha A, Yang L, et al. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes recognize multiple highly conserved epitopes. Fine specificity of the gag-specific response defined by using unstimulated peripheral blood mononuclear cells and cloned effector cells. *J Immunol*. 1991;147(5):1512-1521.
77. Lucchiari-Hartz M, Van Endert PM, Lauvau G, et al. Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: generation of multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasomes. *J Exp Med*. 2000;191(2):239-252.
78. Wilson CC, Palmer B, Southwood S, et al. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol*. 2001;75(9):4195-4207.
79. Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, et al. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the

- presence of broadly recognized peptides. *J Virol.* 2004;78(9):4463–4477.
80. Pancré V, Delhem N, Yazdanpanah Y, et al. Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine.* 2007;25(31):5927–5937.
  81. Buggert M, Norström MM, Czarnecki C, et al. Characterization of HIV-specific CD4+ T cell responses against peptides selected with broad population and pathogen coverage. *PLoS One.* 2012;7(7):e39874.
  82. Ranasinghe S, Flanders M, Cutler S, et al. HIV-specific CD4 T cell responses to different viral proteins have discordant associations with viral load and clinical outcome. *J Virol.* 2012;86(1):277–283.
  83. Schieffer M, Jessen HK, Oster AF, et al. Induction of Gag-specific CD4 T cell responses during acute HIV infection is associated with improved viral control. *J Virol.* 2014;88(13):7357–7366.
  84. Pérez CL, Larsen MW, Gustafsson R, et al. Broadly immunogenic HLA class I supertype-restricted elite CTL epitopes recognized in a diverse population infected with different HIV-1 subtypes. *J Immunol.* 2008;180(7):5092–5100.
  85. Streeck H, Jolin JS, Qi Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells. *J Virol.* 2009;83(15):7641–7648.
  86. Hertz T, Ahmed H, Friedrich DP, et al. HIV-1 vaccine-induced T-cell responses cluster in epitope hotspots that differ from those induced in natural infection with HIV-1. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003404.
  87. Inwoley A, Recordon-Pinson P, Dupuis M, et al. Cross-clade conservation of HIV type 1 Nef immunodominant regions recognized by CD8+ T cells of HIV type 1 CRF02\_AG-infected Ivoirian (West Africa). *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005;21(7):620–628.
  - **Demonstration that ANRS lipopeptide vaccines based on clade B HIV-1 induced cross-clade CD8 T cell responses.**
  88. Daubersies P, Thomas AW, Millet P, et al. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat Med.* 2000;6(11):1258–1263.
  89. Le Gal FA, Prevost-Blondel A, Lengagne R, et al. Lipopeptide-based melanoma cancer vaccine induced a strong MART-27-35-cytotoxic T lymphocyte response in a preclinical study. *Int J Cancer.* 2002;98(2):221–227.
  90. Bettahi I, Nesburn AB, Yoon S, et al. Protective immunity against ocular herpes infection and disease induced by highly immunogenic self-adjuncting glycoprotein D lipopeptide vaccines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(10):4643–4653.
  91. Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, et al. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res.* 1998;4(9):2103–2109.
  92. Xu DH, Zhou CH, Xia YP, et al. Cytotoxic T lymphocyte response induced by an improved synthetic lipopeptide vaccine against cervical cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(5):695–702.
  93. Livingston BD, Crimi C, Grey H, et al. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J Immunol.* 1997;159(3):1383–1392.
  94. Diamond DJ, York J, Sun JY, et al. Development of a candidate HLA A\*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood.* 1997;90(5):1751–1767.
  95. Chua BY, Eriksson EM, Brown LE, et al. A self-adjuncting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine.* 2008;26(37):4866–4875.
  96. Alphs HH, Gambhira R, Karanam B, et al. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(15):5850–5855.
  97. Pejowski D, Zeng W, Rockman S, et al. A lipopeptide based on the M2 and HA proteins of influenza A viruses induces protective antibody. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(5):605–611.
  98. Klinguer C, David D, Kouach M, et al. Characterization of a multi-lipopeptides mixture used as an HIV-1 vaccine candidate. *Vaccine.* 1999;18(3–4):259–267.
  99. Gahéry-Ségard H, Pialoux G, Charmeteau B, et al. Multi-epitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *J Virol.* 2000;74(4):1694–1703.
  - **The first lipopeptide preparation used as a prophylactic HIV-1 vaccine candidate in human healthy volunteers.**
  100. Pialoux G, Gahéry-Ségard H, Sermet S, et al. Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers. *Aids.* 2001;15(10):1239–1249.
  101. Gahéry-Ségard H, Pialoux G, Figueiredo S, et al. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8+ T-cell epitopes recognized. *J Virol.* 2003;77(20):11220–11231.
  102. Gahery H, Figueiredo S, Texier C, et al. HLA-DR-restricted peptides identified in the Nef protein can induce HIV type 1-specific IL-2/IFN-gamma-secreting CD4+ and CD4+/CD8+ T cells in humans after lipopeptide vaccination. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007;23(3):427–437.
  103. Launay O, Durier C, Desaint C, et al. Cellular immune responses induced with dose-sparing intradermal administration of HIV vaccine to HIV-uninfected volunteers in the ANRS VAC16 trial. *PLoS One.* 2007;2(8):e725.
  104. Launay O, Surenaud M, Desaint C, et al. Long-term CD4(+) and CD8(+) T-cell responses induced in HIV-uninfected volunteers following intradermal or intramuscular administration of an HIV-lipopeptide vaccine (ANRS VAC16). *Vaccine.* 2013;31(40):4406–4415.
  105. Frey SE, Peiperl L, McElrath MJ, et al. Phase I/II randomized trial of safety and immunogenicity of LIPO-5 alone, ALVAC-HIV (vCP1452) alone, and ALVAC-HIV (vCP1452) prime/LIPO-5 boost in healthy, HIV-1-uninfected adult participants. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(11):1589–1599.
  106. Keating SM, Bejon P, Berthoud T, et al. Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. *J Immunol.* 2005;175(9):5675–5680.
  107. Richert L, Hue S, Hocini H, et al. Cytokine and gene transcription profiles of immune responses elicited by HIV lipopeptide vaccine in HIV-negative volunteers. *Aids.* 2013;27(9):1421–1431.
  108. Richert L, Doussau A, Lelièvre JD, et al. Accelerating clinical development of HIV vaccine strategies: methodological challenges and considerations in constructing an optimised multi-arm phase I/II trial design. *Trials.* 2014;15:68.
  109. Brandler S, Lepelletier A, Desdouts M, et al. Preclinical studies of a modified vaccinia virus Ankara-based HIV candidate vaccine: antigen presentation and antiviral effect. *J Virol.* 2010;84(10):5314–5328.
  110. Blazevic V, Männik A, Malm M, et al. Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with a novel gene transport unit (GTU)-MultiHIV DNA vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006;22(7):667–677.
  111. Lelièvre JD, Lacabaratz C, Wiedemann A, et al. Immunogenicity and safety of 4 prime-boost combinations of HIV vaccine candidates (MVAHIV-B; LIPO-5; GTU-MultiHIV B) in healthy volunteers - ANRS/INSERM VRI01 phase I/II randomized trial. In: Poster session presented at: 9th IAS Conference on HIV Science; 2017 Jul 23–26; Paris.
  112. Seth A, Yasutomi Y, Jacoby H, et al. Evaluation of a lipopeptide immunogen as a therapeutic in HIV type 1-seropositive individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2000;16(4):337–343.
  - **First HIV-1 therapeutic human trial using a lipopeptide as a vaccine candidate.**
  113. Gahery H, Daniel N, Charmeteau B, et al. New CD4+ and CD8+ T cell responses induced in chronically HIV type-1-infected patients after immunizations with an HIV type 1 lipopeptide vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006;22(7):684–694.
  - **Demonstration that a therapeutic vaccine using lipopeptides could induce new T-cell responses in HIV-seropositive patients.**

114. Pialoux G, Quercia RP, Gahery H, et al. Immunological responses and long-term treatment interruption after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) lipopeptide immunization of HIV-1-infected patients: the LIPThERA study. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(3):562–568.
115. Lévy Y, Gahéry-Ségard H, Durier C, et al. Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *Aids*. 2005;19(3):279–286.
- **Vaccine-elicited anti-HIV-1 immunological responses induced after lipopeptide therapeutic vaccination were predictive of virological control.**
116. Lévy Y, Durier C, Lascaux AS, et al. Sustained control of viremia following therapeutic immunization in chronically HIV-1-infected individuals. *Aids*. 2006;20(3):405–413.
117. Goujard C, Marcellin F, Hendel-Chavez H, et al. Interruption of antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection: impact of a therapeutic vaccination strategy combined with interleukin (IL)-2 compared with IL-2 alone in the ANRS 095 Randomized Study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(9):1105–1113.
118. Moir S, Buckner CM, Ho J, et al. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*. 2010;116(25):5571–5579.
119. Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ, et al. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3382–3387.
120. Pollard RB, Rockstroh JK, Pantaleo G, et al. Safety and efficacy of the peptide-based therapeutic vaccine for HIV-1, Vacc-4x: a phase 2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(4):291–300.
121. Boffito M, Fox J, Bowman C, et al. Safety, immunogenicity and efficacy assessment of HIV immunotherapy in a multi-centre, double-blind, randomised, Placebo-controlled Phase Ib human trial. *Vaccine*. 2013;31(48):5680–5686.
122. Borthwick N, Ahmed T, Ondondo B, et al. Vaccine-elicited human T cells recognizing conserved protein regions inhibit HIV-1. *Mol Ther*. 2014;22(2):464–475.
123. Rosario M, Borthwick N, Stewart-Jones GB, et al. Prime-boost regimens with adjuvanted synthetic long peptides elicit T cells and antibodies to conserved regions of HIV-1 in macaques. *Aids*. 2012;26(3):275–284.
124. Reguzova A, Antonets D, Karpenko L, et al. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116412.
125. Palucka AK, Ueno H, Fay JW, et al. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev*. 2007;220:129–150.
126. Garcia F, Routy JP. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1. *Vaccine*. 2011;29(38):6454–6463.
127. Carboneil C, Aouba A, Burgard M, et al. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- $\alpha$  are potent inducers of HIV-specific CD8 T cells. *AIDS*. 2003;17(12):1731–1740.
128. Cobb A, Roberts LK, Palucka AK, et al. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine. *J Immunol Methods*. 2011;365(1–2):27–37.
129. Lévy Y, Thiébaud R, Montes M, et al. Dendritic cell-based therapeutic vaccine elicits polyfunctional HIV-specific T-cell immunity associated with control of viral load. *Eur J Immunol*. 2014;44(9):2802–2810.
- **An inverse correlation was found between the maximum of HIV viral load after analytic treatment interruption and the frequency of polyfunctional CD4 T cells, production of IL-2, IFN $\gamma$ , IL-21, and IL-13 induced by the DALIA therapeutic vaccination in HIV-seropositive patients. These results suggest an association between vaccine responses and a better control of viral replication.**
130. Brezar V, Ruffin N, Richert L, et al. Decreased HIV-specific T-regulatory responses are associated with effective DC-vaccine induced immunity. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004752.
131. Yin W, Gorvel L, Zurawski S, et al. Functional speciality of CD40 and dendritic cell surface lectins for exogenous antigen presentation to CD8(+) and CD4(+) T cells. *EBioMedicine*. 2016;5:46–58.
132. Flamar AL, Contreras V, Zurawski S, et al. Delivering HIV Gaggp24 to DCIR induces strong antibody responses in vivo. *PLoS One*. 2015;10(9):e0135513.
133. Zurawski G, Zurawski S, Flamar AL, et al. Targeting HIV-1 Env gp140 to LOX-1 elicits immune responses in Rhesus Macaques. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153484.
- **First demonstration of the in vivo HIV-1 Env DC-targeting efficacy in NHPs.**
134. Zurawski G, Shen X, Zurawski S, et al. Superiority in Rhesus Macaques of targeting HIV-1 Env Gp140 to CD40 Versus LOX-1 in combination with replication competent NYVAC-KC for induction of Env-specific antibody and T cell responses. *J Virol*. 2017 Feb 15; pii: JVI.01596-16. [Epub ahead of print]. DOI:10.1128/JVI.01596-16.
135. Lévy Y, Zurawski S, Flamar AL, et al. Vaccines for therapeutic cellular immunity that target HIV Gag, Pol, and Nef epitopes to CD40 and DCIR elicit T cell responses in Rhesus Macaques. In: Poster session presented at: HIV Research for Prevention (R4P); 2014 Oct 28–31; Cape Town.
136. Flamar AL, Xue Y, Zurawski SM, et al. Targeting concatenated HIV antigens to human CD40 expands a broad repertoire of multifunctional CD4+ and CD8+ T cells. *Aids*. 2013;27(13):2041–2051.
- **Development of the HIV5pep in vivo DC-targeting for clinical use in humans.**
137. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*. 2009;361(23):2209–2220.
138. McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, et al. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet*. 2008;372(9653):1894–1905.
139. Janes HE, Cohen KW, Frahm N, et al. Higher T-cell responses induced by DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine are associated with lower HIV-1 infection risk in an efficacy trial. *J Infect Dis*. 2017;215(9):1376–1385.
140. McMichael AJ, Picker LJ. Unusual antigen presentation offers new insight into HIV vaccine design. *Curr Opin Immunol*. 2017;46:75–81.
141. Durier C, Launay O, Meiffredy V, et al. Clinical safety of HIV lipopeptides used as vaccines in healthy volunteers and HIV-infected adults. *Aids*. 2006;20(7):1039–1049.
142. Pialoux G, Hocini H, Pérusat S, et al. Phase I study of a candidate vaccine based on recombinant HIV-1 gp160 (MN/LA) administered by the mucosal route to HIV-seronegative volunteers: the ANRS VAC14 study. *Vaccine*. 2008;26(21):2657–2666.
143. BenMohamed L, Krishnan R, Auge C, et al. Intranasal administration of a synthetic lipopeptide without adjuvant induces systemic immune responses. *Immunology*. 2002;106(1):113–121.
144. Deliyannis G, Kedzierska K, Lau YF, et al. Intranasal lipopeptide primes lung-resident memory CD8+ T cells for long-term pulmonary protection against influenza. *Eur J Immunol*. 2006;36(3):770–778.
145. BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines—yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(7):425–431.
146. Zhang X, Dervillez X, Chentoufi AA, et al. Targeting the genital tract mucosa with a lipopeptide/recombinant adenovirus prime/boost vaccine induces potent and long-lasting CD8+ T cell immunity against herpes: importance of MyD88. *J Immunol*. 2012;189(9):4496–4509.
147. Figueiredo S, CharmetEAU B, Surenaud M, et al. Memory CD8(+) T cells elicited by HIV-1 lipopeptide vaccines display similar phenotypic profiles but differences in term of magnitude and multifunctionality compared with FLU- or EBV-specific memory T cells in humans. *Vaccine*. 2014;32(4):492–501.
148. Liu R, Wang J, Yang Y, et al. A novel rabies virus lipopeptide provides a better protection by improving the magnitude of DCs activation and T cell responses. *Virus Res*. 2016;221:66–73.

## II. Annexe 2 : Article méthodologique « Optimization and evaluation of Luminex performance with supernatants of antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells »

Surenaud et al. *BMC Immunology* (2016) 17:44  
DOI 10.1186/s12865-016-0182-8

BMC Immunology

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access



# Optimization and evaluation of Luminex performance with supernatants of antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells

Mathieu Surenaud<sup>1,2,3</sup>, Céline Manier<sup>1,2,3</sup>, Laura Richert<sup>3,4,5,6</sup>, Rodolphe Thiébaud<sup>3,4,5,6</sup>, Yves Levy<sup>1,2,3,7</sup>, Sophie Hue<sup>1,2,3,8</sup> and Christine Lacabaratz<sup>1,2,3\*</sup> 

### Abstract

**Background:** The Luminex bead-based multiplex assay is useful for quantifying immune mediators such as cytokines and chemokines. Cross-comparisons of reagents for this technique from different suppliers have already been performed using serum or plasma but rarely with supernatants collected from antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Here, we first describe an optimization protocol for cell culture including quantity of cells and culture duration to obtain reproducible cytokine and chemokine quantifications. Then, we compared three different Luminex kit suppliers.

**Results:** Intraclass correlation coefficients (ICCs) for a 2-days stimulation protocol were >0.8 for IFN $\gamma$  and Perforin. The specific concentration was maximal after two or five days of stimulation, depending on the analyte, using 0.5 million PBMC per well, a cell quantity that gave the same level of specific cytokine secretion as 1.0 million. In the second part of the study, Luminex kits from Millipore showed a better working range than Bio-Rad and Ozyme ones. For tuberculin purified protein derivative (PPD)-stimulated samples, the overall mean pooled coefficients of variation (CVs) for all donors and all cytokines was 17.2 % for Bio-Rad, 19.4 % for Millipore and 26.7 % for Ozyme. Although the different kits gave cytokine concentrations that were generally compatible, there were discrepancies for particular cytokines. Finally, evaluation of precision and reproducibility of a 15-plex Millipore kit using a "home-made" internal control showed a mean intra-assay CV <13 % and an inter-assay CV <18 % for each cytokine concentration.

**Conclusions:** A protocol with a single round of stimulation but with two time points gave the best results for assaying different cytokines. Millipore kits appear to be slightly more sensitive than those from Bio-Rad and Ozyme. However, we conclude that the panel of analytes that need to be quantified should be the main determinant of kit selection. Using an internal control we demonstrated that a 15-plex magnetic Milliplex kit displayed good precision and reproducibility. Our findings should help optimize assays for evaluating immune responses during the course of disease or infection, or in response to vaccine or therapy.

**Keywords:** Luminex, Cytokine, Reproducibility, Precision, Culture supernatant

\* Correspondence: christine.lacabaratz@inserm.fr

<sup>1</sup>INSERM, U955, Equipe 16, Créteil F-94010, France

<sup>2</sup>Université Paris Est, Faculté de médecine, Créteil F-94010, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Cytokines and chemokines are soluble molecules playing key roles in the innate and adaptive immune responses. Quantifying these immune mediators has become increasingly important to obtain better descriptions of immune responses during the course of disease or infections, or to a vaccine, therapy and intervention; such detailed descriptions allow the identification of correlates of cure or protection. Various methods can be used to measure cytokines and chemokines, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is still the most extensively employed [1]. This monoplex antibody-based immunoassay has been used for more than fifty years but can be laborious, sample consuming and expensive when studying profiles of large numbers of cytokines and chemokines. Therefore, a number of new technologies allowing simultaneous quantitative measurements of multiple cytokines and chemokines in small sample volumes have recently been developed. These multiplex immunoassay systems can be divided into two classes: planar assays and suspension microsphere assays [2]. The Multi-array Meso Scale Discovery (MSD) electro-chemiluminescence detection system (planar immunoassay) and Luminex xMAP technology (microsphere immunoassay) are considered to be the two most suitable platforms for biomarker analysis or quantification [3–5].

The growing use of Luminex technology has led to different kits being made available by several companies, and we decided to work with this multiplex platform. The Luminex system allows the analysis of up to 100 analytes in a single well. Relatively small volumes (25–50  $\mu$ l) of serum, plasma, other body fluids, or cell culture supernatant can be assayed for cytokines and chemokines. Extensive data have been published validating the Luminex platform for detection of multiple analytes, by comparing this technique with ELISA [6–12]. Cross-comparisons between reagent suppliers showed variability in absolute cytokine concentration results in serum or plasma [13–15]. Moreover, a study comparing Luminex kits from three different companies, including World Health Organization (WHO) cytokine standards in addition to the standards provided with each kit, revealed striking differences in results for cytokine concentrations in serum [16].

There have been few studies comparing different Luminex kits using supernatants from antigen-stimulated cell culture, an approach used in vaccine research. One study compared Luminex kits from three different suppliers for the determination of cytokine levels in whole blood culture supernatant [17], and two studies compared cytokine and chemokine levels in supernatants from antigen specific-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as tested with different commercial Luminex kits [18, 19]. These studies revealed differences of performance

(accuracy, recovery, reproducibility) between the suppliers tested. Defawe and colleagues published a study on optimization and validation of a Luminex protocol to assess cytokine and chemokine production by vaccine-specific cells to allow better characterization of immune responses [20]. However, the optimization of the “cell culture step” described in their work could be improved. The aim of the present study was to optimize a cell culture protocol (including quantity of cells, culture duration, and positive control) to obtain reproducible cytokine and chemokine quantifications by Luminex technology in antigen-stimulated PBMC supernatants; the second aim was then to compare the performances of different Luminex kits.

## Results

### Reproducibility of the Luminex assay

We first performed an intra-laboratory reproducibility study with a multiplex assay developed and shared by the Baylor Institute for Immunology Research (BIIR) and using polystyrene beads (Table 1). PBMC from six Human Immunodeficiency virus (HIV)-infected patients (CD4 count > 500 mm<sup>3</sup>, viral load < 50 copies/ml) were cultured without stimulation or with: (i) LIPO-5 HIV-1 vaccine [21], (ii) a mix of five long HIV-1 peptides (LP mix), (iii) a 15-mers HIV-1 peptide pool and (iv) Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) as a positive control. Three independent cultures were performed: 1 million PBMC/well were cultured in triplicate for 2 and 11 days, and assayed for IFN $\gamma$ , perforin, IL-5 and IL-17. In the 11 day-cultures (two-step stimulation protocol), high concentrations and large variations were observed for all cytokines with SEB and peptide stimulations (Additional file 1: Figure S1). For example, LP mix induced from 4,810 to 357,392 pg/ml for IFN $\gamma$  with PBMC from patient A and from 16 to 5,421 pg/ml for perforin with PBMC from patient B. By contrast, a short stimulation period without re-stimulation could lead to more reproducible results (Additional file 2: Figure S2). At day 2, SEB strongly stimulated the PBMC, and IL-17 (the lower secreted cytokine) measurement seemed to be the most variable (24 to 66 pg/ml for patient A and 43 to 135 pg/ml for patient B). HIV-specific stimulation induced very low concentrations of IL-5 and IL-17, but the LP mix resulted, in samples from patient A, in an IFN $\gamma$  concentration from 2,932 to 12,091 pg/ml and a Perforin concentration of 3,403 to 4,511 pg/ml. As expected, intraclass correlation coefficients (ICCs) for HIV-stimulated samples for the 11-day stimulations were low (Table 2) whereas good ICCs (>0.8) were observed with the 2-day cultures for IFN $\gamma$  (using either FI or concentrations) and Perforin (using concentration in range only). We excluded extrapolated concentration values, i.e., below or above the limits of quantification (LOQ) and corresponding fluorescent

**Table 1** Description of Luminex kits

Supplier	Kit name	Type of beads	Number of analytes	Analytes	Part of the study
BIIR + Biologend	-	Polystyrene	4	IFN $\gamma$ , IL-5, IL-17 + Perforin	Reproducibility
Millipore	Milliplex MAP Human Cytokine (#SPRI137)	Magnetic	11	IL-17, IL-21, IP-10, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$	Kinetics of cytokine production + Quantity of stimulated PBMC
Millipore	Milliplex MAP Human Cytokine (#SPRI171)	Polystyrene	10	IL-17, IL-21, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$	Kinetics of cytokine production + Quantity of stimulated PBMC
Millipore	Milliplex MAP Human Th17	Magnetic	10	IL-17A, IL-22, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$	Kinetics of cytokine production + Quantity of stimulated PBMC
Ozyme	Procarta Immunoassays kit (Affymetrix)	Magnetic	16	GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-22, IL-5, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$	Comparison of commercial Luminex Kits
Millipore	Milliplex MAP Human Cytokine (#SPRI158) + Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine	Magnetic	15 + 1	GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-22, IL-5, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ + IL-12p40	Comparison of commercial Luminex Kits
Bio-Rad	Bio-plex Pro assays + Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine assays	Magnetic	28 + 1	IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, Basic FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF $\alpha$ , VEGF, and IL-12p40 + IL-22	Comparison of commercial Luminex Kits
Millipore	Milliplex MAP Human Th17	Magnetic	15	GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17 F, IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-22, IL-9, CCL20/MIP-3a, IL-5, IL-23, IL-27, and TNF $\alpha$	Internal QC study

**Table 2** Intraclass correlation coefficients (ICCs) across HIV-stimulated samples

Cytokine	Culture duration	FI			Conc <sup>a</sup> (pg/ml)			Conc in range (pg/ml)		
		Samples (n)	Total meas. (n)	ICC	Samples (n)	Total meas. (n)	ICC	Samples (n)	Total meas. (n)	ICC
IFN $\gamma$	11d	16	114	.69	16	107	.11	16	81	.51
Perforin	11d	16	91	.66	16	71	.17	16	61	.72
IL-5	11d	16	114	.36	16	106	.25	16	99	.23
IL-17	11d	16	114	.02	16	69	.02	16	28	.19
IFN $\gamma$	2d	17	135	<b>.93</b>	17	129	<b>.88</b>	17	122	<b>.81</b>
Perforin	2d	17	111	.16	17	97	NA	17	95	<b>.88</b>
IL-5	2d	17	135	.58	17	91	.55	17	86	.53
IL-17	2d	17	135	.43	17	37	.29	1	1	-

ICCs were calculated across 9 replicate cultures. The combination 'donor  $\times$  stimulation' was treated as one sample. *d* day, *Conc* concentration, *meas* measurement. ICCs > 0.8 are indicated in bold

<sup>a</sup>Including extrapolated values, NA: G matrix 'not positive definite'

intensity (FI). Nevertheless, even excluding extrapolated values, ICCs were not in all cases acceptable. For IL-5, the agreement was too low (ICC < 0.6).

#### Kinetics of cytokine production

We performed kinetic studies over 7 days with samples from two healthy donors to determine optimal culture duration for quantification of weakly secreted cytokines in stimulated-PBMC supernatants. First, we found that the culture duration (without rIL-2 supplemented medium) should not be longer than 6 days to maintain cell viability above 70 % using non-stimulated or tuberculin purified protein derivative (PPD)-stimulated PBMC (Additional file 3).

T cell subsets can be characterized according to their cytokine secretion profile. We focused on four cytokines: the T-helper (Th)1 cytokines IFN $\gamma$  and IL-2, the Th2 cytokine IL-5, and the Th17 cytokine IL-17. The optimal culture duration was defined as that giving the highest specific concentration (i.e. the largest positive difference between stimulated and non-stimulated cells). The specific concentration of IL-2 was maximal after two days of stimulation whereas the specific concentration peaks for IFN $\gamma$ , IL-5 and IL-17 were on day 5 (Fig. 1). These findings suggested that different time points (here day 2 and day 5) are required for optimal quantifications of different cytokines in supernatants from antigen-stimulated PBMC.

#### Number of stimulated PBMC

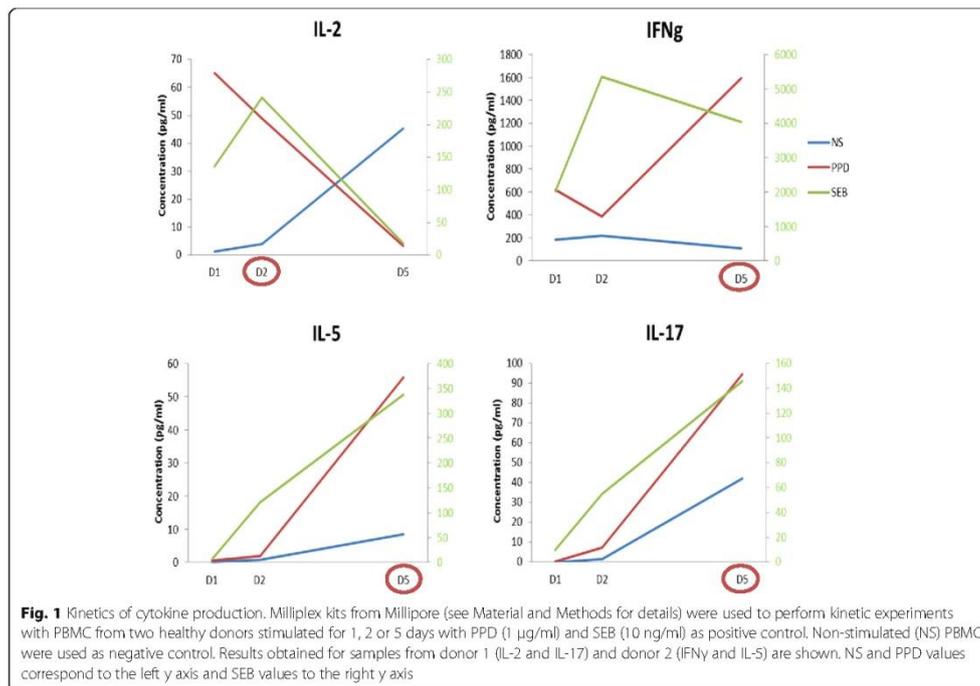
The quantity of PBMC available in clinical trials and the numbers of specific cells are often small, so we compared the use of 0.5 and 1.0 million cells per well. PBMC from two healthy donors were stimulated with PPD and assayed for the same four cytokines at their optimal time point (Fig. 2). The concentration of IL-2 was slightly lower after the stimulation of 0.5 million of PBMC per well than 1.0 million of PBMC/well (29 vs. 49 pg/ml) without any difference in the background (4 pg/ml). The

concentration of IFN $\gamma$  was also slightly lower with 0.5 million than 1.0 million stimulated PBMCs (942 vs. 1,596 pg/ml), but a similar relative difference was observed for the background (49 vs. 112 pg/ml). There was no significant difference in IL-5 concentrations between the two densities of PBMC. The concentration of IL-17 following PPD stimulation was similar at the two densities of PBMC but the background was significantly lower at 0.5 million PBMCs per well (3 vs. 17 pg/ml). Thus, the stimulation of PBMC at 0.5 and 1.0 million per well resulted in relatively similar levels of specific cytokine secretion (i.e. background subtracted).

#### Comparison of three commercial Luminex kits

Next, we compared Luminex kits supplied by different manufacturers (Millipore, Ozyme and Bio-Rad). We first analysed mean % CV from standard and samples coming from polystyrene bead based 10-plex and magnetic bead based 15-plex kits and found that they were lower with magnetic beads (3.1 and 15.5, respectively) compared to polystyrene ones (5.3 and 25.1, respectively), thus confirming the better precision of magnetic kits as previously described [19]. In the next experiments, only Luminex kits using magnetic beads were selected and analytes were quantified at their optimal time point previously defined.

We first compared vendor-reported (theoretical) working range (lower limit of quantification (LLOQ) and upper limit of quantification (ULOQ)) and experimental working range for each kit. The working range was defined as that for which the observed concentration was between 70 % and 130 % of expected concentration using the five parameter log-logistic (5PL) standard curve. The 16 cytokines common to the three kits were studied and the results are summarized in Table 3. A sensitivity lower than that reported by the vendor was observed for some analytes for all kits. The LLOQ was particularly discordant with Ozyme and Bio-Rad kits for GM-CSF and especially with the Bio-Rad kit for IL-12p40 (302.6 pg/ml instead of

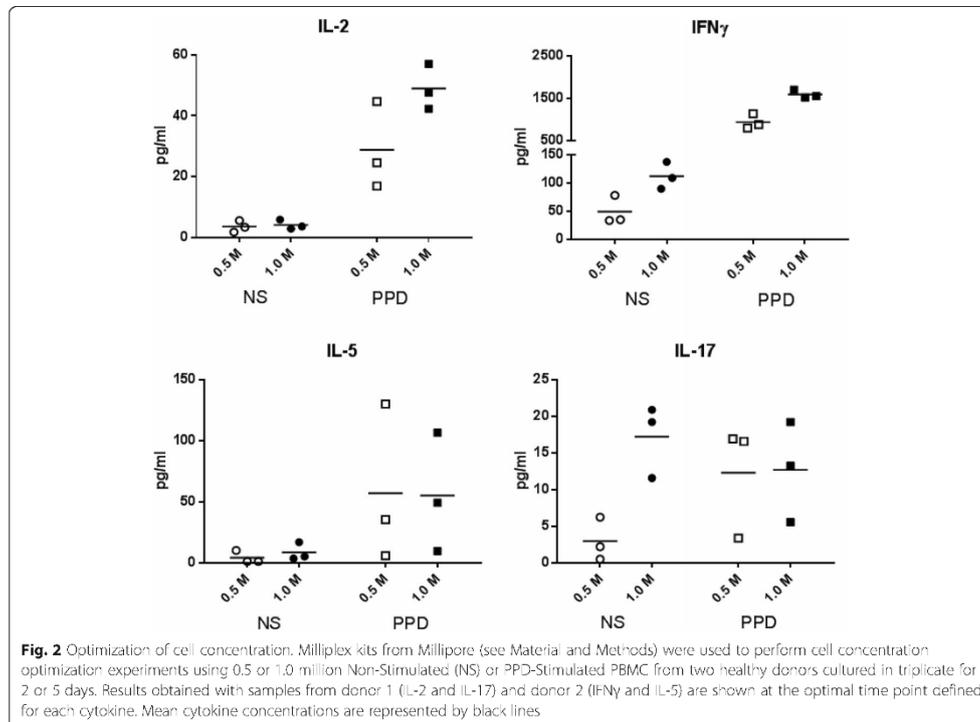


15.5  $\text{pg/ml}$ , a three dilution difference). Ozyme and Bio-Rad kits also showed a narrower standard spectrum than expected: the observed ULOQ diverged by one or two dilutions from the theoretical value for many cytokines. Overall, we obtained a better working range with Millipore than Ozyme and Bio-Rad kits.

We then used intra-assay coefficients of variation (CVs) to compare the precision of the three kits with standards and samples. All kits performed well for standard intra-assay precision: the mean of standard intra-plate CVs for the 16 common cytokines was below 8 % for all kits (Additional file 4: Figure S3). As this work was initially performed to select the best Luminex kit for a TB/HIV study, PBMC from two healthy donors, one HIV-1-positive patient and one tuberculosis (TB)-positive patient were cultured in triplicate for 2 and 5 days without antigen (NS) or with PPD, early secreted antigenic target 6 kDa protein (ESAT-6) or SEB. The supernatant of each culture well was considered to be one sample for Luminex analysis. Not all the cytokines were included in the final analysis because their values were above the ULOQ (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and IL-6) or below the LLOQ (IL-12p40). Eleven common cytokines were thus analyzed: IP-10, IL-10, IL-1 $\beta$  and IL-2 after 2-day culture and IL-5,

GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-13, IL-22, and TNF $\alpha$  after 5-day culture. CVs of three culture replicates for these 11 cytokines were plotted against the mean concentration for NS, PPD, SEB and ESAT-6 stimulations. A characteristic non-linear relationship was observed for all kits (Additional file 5: Figure S4): the CV rose substantially as the mean value approached zero.

Figure 3 shows %CVs obtained for each kit according to culture conditions — NS, PPD- and SEB-stimulated PBMC — highlighting the generally accepted 25 % cutoff value for biomarker assay precision [22]. For SEB stimulations, the overall mean pooled CV for all donors and all cytokines (calculated from triplicates per cytokine and per patient) was between 1 and 18 %. For PPD stimulations, the values were 17.2 % for Bio-Rad, 19.4 % for Millipore and 26.7 % for Ozyme; only the IL-5 CV was above the 25 % threshold with the Bio-Rad kit in contrast to Millipore and Ozyme kits which showed CV >25 % for IL-5, IL-13 and IL-17A. Applying a 30 % CV threshold like the study by Defawe and colleagues [20], the Millipore kit gave acceptable %CVs for IL-13. The mean pooled CV was even higher for NS samples: 23.4 % for Ozyme, 25.8 % for Bio-Rad and 29.5 % for Millipore.



Next, we analyzed cytokine concentrations in the supernatant from TB-infected stimulated PBMC. The kits yielded different cytokine concentrations with quality control samples (QCs) from Millipore and these experiments also revealed some cross-reactivities for the Ozyme kit: it detected IL-22 at a high concentration in the Millipore QCs which do not contain this cytokine (Additional file 6). Although the kits gave results that were generally compatible, there were discrepancies between them for particular cytokines (Fig. 4a). Another approach to measuring cytokine production is the use of a stimulation index (SI), calculated as a ratio between mean antigen-stimulated PBMC concentration and mean non-stimulated PBMC concentration. Like Defawe and colleagues [20], we used a SI threshold of 3 for positivity and observed that the kits tested gave divergent results for IL-1 $\beta$  (Fig. 4b). Although no discrepancy between the kits for positive or negative SI was observed for the other cytokines, some SIs differed by 10 to 100 between kits. Thus, our study showed variability in the measurement of cytokine production (either with absolute concentration or SI) in supernatants from antigen-stimulated PBMC with luminex kits coming from different manufacturers.

#### Internal QC for Luminex study

For the last experiment, we used the Millipore kit because: 1) its working range and sensitivity were better than the two other kits tested, 2) %CVs were as good as the other kits, 3) no cross-reactivity was observed, 4) it was the only kit with QCs provided, and 5) it contains most analytes that we were interested in.

A "home-made" internal control (culture supernatant from SEB-stimulated PBMC) was used in addition to the two Millipore QCs (high and low concentration) to evaluate intra- and inter-assay precision and thus to check the reproducibility of the assay. This internal control was used to determine variations observed for a control sample prepared and stored under the same conditions as our study samples. Intra- and inter-assay %CVs for the internal control assayed in duplicate are reported in Fig. 5 and Table 4, respectively, for 13 of the 15 cytokines (IL-23 and IL-1 $\beta$  %CVs were not calculated for the internal control due to concentration values <LLOQ and >ULOQ, respectively). Low intra-assay variability was observed both with the internal control and Millipore QCs. Mean CVs for each cytokine were <13 % for the "home-made" internal control (Fig. 5)

**Table 3** Working range and sensitivities

Analyte	Ozyme				Millipore				Bio-rad			
	theoretical		experimental		theoretical		experimental		theoretical		experimental	
	LLOQ	ULOQ	LLOQ	ULOQ	LLOQ	ULOQ	LLOQ	ULOQ	LLOQ	ULOQ	LLOQ	ULOQ
IL-17A	2.92	47900	2.90	12124 <sup>a</sup>	9.60	30000	1.91	29561	1.78	29157	1.73	24822
IP-10	1.35	22100	1.10	5328 <sup>a</sup>	1.60	5000	7.75 <sup>a</sup>	4999	3.50	57400	3.12	52465
MCP-1	2.95	48400	2.60	12076 <sup>a</sup>	1.60	5000	8.29 <sup>a</sup>	5034	1.52	24920	1.64	24492
MIP-1 $\alpha$	0.52	8550	0.52	534 <sup>b</sup>	1.60	5000	8.33 <sup>a</sup>	5455	1.20	19707	1.21	3630 <sup>a</sup>
MIP-1 $\beta$	6.56	107500	24.58 <sup>a</sup>	108640	1.60	5000	7.42 <sup>a</sup>	4979	0.85	13960	1.03	10114
GM-CSF	4.29	70300	59.10 <sup>b</sup>	70495	50.00	130000	10.00	117900	1.24	20314	16.27 <sup>b</sup>	20993
IFN $\gamma$	0.20	3200	0.20	2323	8.00	25000	1.81	24966	2.13	34920	7.50 <sup>a</sup>	34918
IL-10	0.34	5550	0.27	5424	2.40	7500	0.40	7502	1.59	26094	1.56	6551 <sup>a</sup>
IL-13	2.89	47400	2.68	48745	6.40	20000	1.37	20019	2.40	39338	2.43	9065 <sup>a</sup>
IL-22	13.47	220700	13.56	13752 <sup>b</sup>	24.00	75000	4.66	75275	4.19	68313	4.22	17087 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$	0.71	11700	0.71	10791	4.80	15000	1.00	15029	1.90	31130	1.91	6893 <sup>a</sup>
IL-2	0.40	6550	1.25 <sup>a</sup>	7119	9.60	30000	1.92	30166	0.84	13690	3.09 <sup>a</sup>	14356
IL-5	0.84	13800	3.28 <sup>a</sup>	16674	5.60	17500	1.20	17052	2.34	38356	2.35	2392 <sup>b</sup>
IL-6	0.92	15000	0.83	14549	3.20	10000	0.53	10233	1.54	25160	1.56	23428
TNF $\alpha$	2.05	33600	1.87	2099 <sup>b</sup>	3.20	10000	0.68	9999	6.54	107172	6.78	26507 <sup>a</sup>
IL-12p40	3.34	54700	3.28	3092 <sup>b</sup>	3.20	10000	15.46 <sup>a</sup>	9965	4.72	77321	302.60 <sup>c</sup>	77346

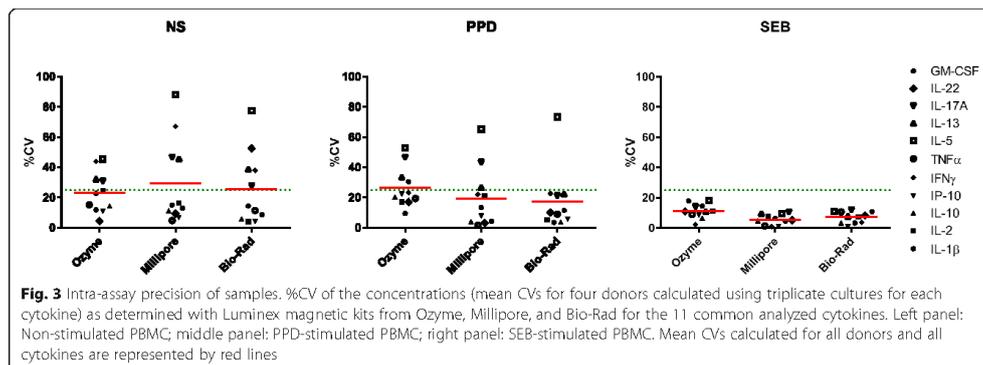
Differences between theoretical and experimental limits of quantifications (LOQs) expressed in pg/ml are highlighted with <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, and <sup>c</sup> for 1-dilution, 2-dilution and 3-dilution differences from theoretical LOQ, respectively

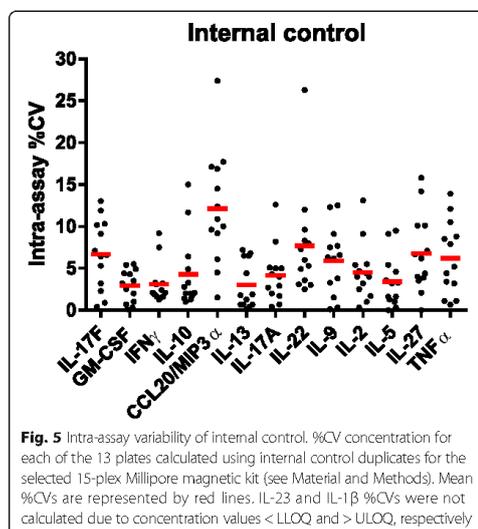
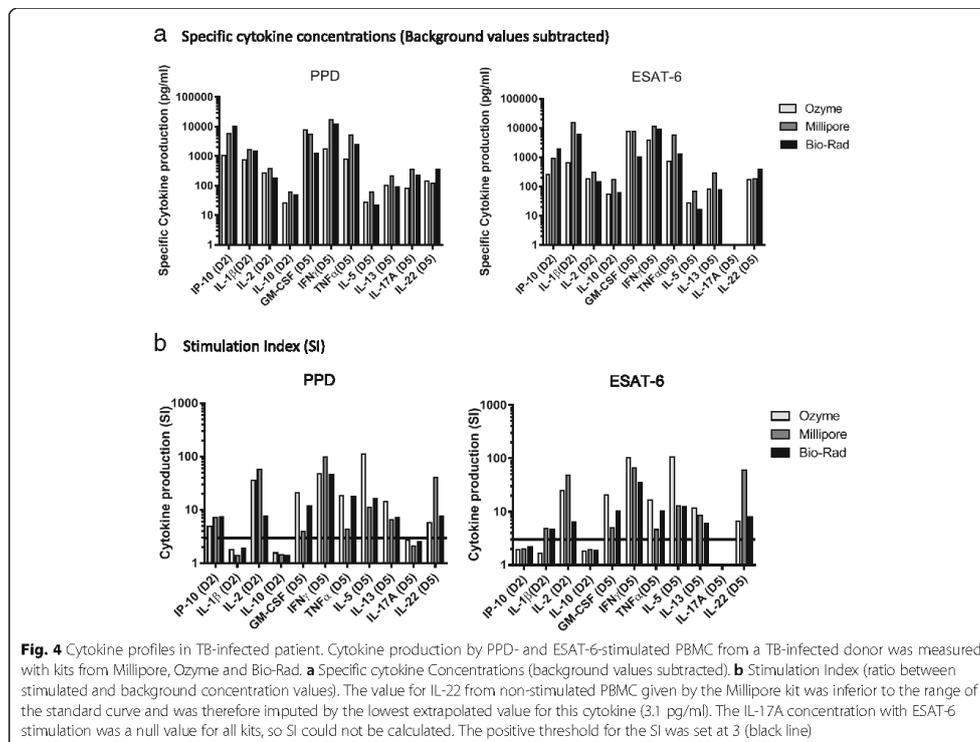
and <7 % for Millipore QCs (Additional file 7). Only two of the 169 calculated intra-assay CVs for the internal control were above the 25 % threshold. The inter-assay variability was also low. The CV was <18 % for each cytokine concentration in the internal control (Table 4), and <14 % in the Millipore QCs (Additional file 7). Thus, the Millipore Milliplex kits demonstrated a good precision and reproducibility in our hands.

### Discussion

The Luminex platform is widely used to study immune responses but only few studies evaluated its reproducibility

and/or compared kits from different suppliers using supernatants from stimulated PBMC [18–20]. This work was designed to evaluate reproducibility of cytokine quantification by Luminex assay in supernatants from antigen-stimulated PBMC and to improve this quantification by optimization of the culture protocol and eventually the choice a particular commercial kit. We used cryopreserved PBMC because such samples are typical of those used in clinical trials. Moreover, it has been shown that using validated standard operating procedures (SOPs) for isolation, cryopreservation and thawing of PBMC, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells maintain full functionality in cytokine enzyme-linked





immunospot (ELISpot) assays [23]. We first tested two different stimulation protocols: a two-round stimulation (i.e. cytokine measurement on day 11, after a first stimulation on day 0 and a re-stimulation on day 9) in the presence of rIL-2 supplemented medium, and a one-round stimulation for 1 to 7 days without rIL-2 supplemented medium. The two-round stimulation protocol induced a lot of variability. However, this type of protocol could be valuable to investigate “on/off” signals if no precise quantification of secreted cytokines is required. We also observed some variability, although to a lesser extent, with the 48 h stimulation protocol. Like ELISpot assay, the observed variability with the Luminex assay, which is inherent to cell culture, probably resulted in part from variations in counting and pipetting, and low antigen-specific cell frequency [24]. One way to minimize this variability is to perform multi-well stimulations and to pool supernatants before assaying them by the Luminex platform.

Another factor to take into consideration for cytokine quantifications in stimulated-PBMC supernatants is the cell viability. Defawe et al. claimed that a high cell viability limited the potential effect of dead cells on cytokine

**Table 4** Inter-assay variability of internal control

Plates	IL-17F	GM-CSF	IFN $\gamma$	IL-10	CCL20/MIP3 $\alpha$	IL-13	IL-17A	IL-22	IL-9	IL-2	IL-5	IL-27	TNF $\alpha$
1	2091.2	7423.2	5300.1	81.4	9523.6	2248.3	74.0	45.4	225.6	89.8	191.9	808.9	3424.9
2	2059.3	6734.8	6833.8	82.0	9009.3	2537.1	90.9	65.0	256.9	107.0	224.2	1081.6	4126.7
3	1963.3	6811.0	5144.7	74.7	5706.4	2268.3	82.2	46.3	216.1	90.9	214.7	786.4	3571.6
4	2215.3	8326.4	5348.7	78.4	8241.1	2412.0	83.1	53.8	231.1	104.7	205.1	1308.3	3953.4
5	1998.1	6735.9	5506.4	61.1	8311.7	2064.6	72.1	48.5	195.9	89.2	172.9	1026.8	3385.1
6	2238.5	7407.3	6040.5	85.1	6113.7	2259.9	89.1	61.5	263.3	84.2	218.3	1093.6	4302.2
7	2473.7	8788.0	5809.2	71.3	8211.6	2560.0	88.3	47.0	278.8	98.5	243.6	1102.3	4128.4
8	2425.1	7440.4	5180.8	81.6	10147.7	2429.5	84.7	50.8	254.4	105.9	214.3	1190.2	4310.1
9	1945.9	6719.6	4545.8	68.4	8901.7	2384.8	82.4	53.3	198.0	95.8	221.2	1175.7	4241.0
10	2165.8	7817.6	7052.7	88.5	10767.6	2729.8	87.8	50.3	296.4	110.3	241.2	1070.5	5285.1
11	2185.4	6660.9	4907.7	68.6	8756.7	2387.7	70.6	39.6	180.1	91.9	170.5	914.5	3409.2
12	2151.4	7223.0	5796.1	65.0	8429.9	2304.6	71.1	42.6	224.8	86.8	195.3	1088.9	4515.4
13	2231.2	7964.7	5324.4	78.5	7028.9	2618.0	87.1	51.7	237.8	113.9	230.2	1249.2	4951.5
%CV	7.4	9.2	12.8	11.0	17.2	7.4	9.0	14.0	14.4	10.0	11.0	14.6	14.3

Mean concentration values of duplicate Internal Controls (pg/ml) and %CVs of mean concentration calculated using the 13 inter-plates internal control mean concentration values for the selected 15-plex Millipore magnetic kit (see Material and Methods section for detailed analyses). IL-23 and IL-1 $\beta$  %CVs were not calculated due to concentration values < LLOQ and > ULOQ, respectively

content measured by Luminex [20]. However, we observed that having cell viability above 80 % on the day of stimulation (D0) was not sufficient to ensure low cell mortality during the culture. Indeed, a dose of 100 ng/ml SEB (10-fold lower than that used in the study by Defawe and colleagues) killed near 50 % of PBMC after 5 days of culture (data not shown). Consequently, the antigen dose needs to be adapted.

Our results suggest that two different time-points are required for optimal quantifications of different cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-5 and IL-17) in supernatants from antigen-stimulated PBMC. This is consistent with published results. Indeed, differences in the kinetics of IFN $\gamma$  and IL-2 production have already been observed in whole blood cell cultures [25]. The duration of in vitro stimulation of PBMC with recall antigens determines the subset distribution of IFN $\gamma$ -producing cells, and 4 or 5 days of stimulation are necessary to have a predominance of IFN $\gamma$ -secreting T cells [26]. Lagrelius and colleagues reported that 3 and 7 days are the most suitable periods for stimulation to measure various cytokine levels in whole blood supernatant [27]. Furthermore, our results validating the use of 0.5 million PBMC per well are in agreement with those obtained by others with cytomegalovirus (CMV) stimulation [20].

After setting up our protocol for cytokine measurements in supernatants coming from antigen-stimulated PBMC, we compared results obtained with Luminex magnetic kits coming from three different manufacturers. We observed a lower sensitivity than that reported by the vendor for some analytes for all kits but overall, we obtained a better working range with Millipore than Ozyme

and Bio-Rad kits. Also, Djoba Siawaya and colleagues reported a comparison between commercial Luminex cytokine kits using whole blood supernatant and concluded that the LINCO (now Millipore) kit was the most sensitive for measuring concentrations of numerous recombinant cytokines in samples that had been spiked with serial dilutions of the standards provided by the manufacturer [17]. Consistent with our results, Belabani and colleagues showed that a Bio-Rad magnetic Luminex kit was not as sensitive as suggested by the manufacturer for some cytokines [28]. In their condensed performance-validation strategy for multiplex detection kits used in studies of human clinical samples recently published, these authors proposed a complete validation of Luminex assays. Among the critical points, we would also recommend 1) extending the standard curve to include lower values to check the working range and true sensitivity; 2) including LLOQs and ULOQs as validation samples to validate their concentration; 3) excluding values below the LLOQ or using specific statistical analyses that takes into account left-censoring [29]; 4) diluting and reanalyzing all samples with a concentration above the ULOQ; and 5) fixing the thresholds of %CV and %Recovery at 25 % (30 % for LLOQs) as acceptance criteria for samples, as defined by Lee and colleagues [22].

We then compared the precision of the three kits with standards and samples. It is important to note that we used here triplicate cultures in our Luminex assays (and not supernatant pooled from several culture wells) to estimate the variability cytokine assays results, and this could explain at least in part the high variability observed. As observed for ELISpot [23], but also tetramer

assays and cytokine flow cytometry [24], the relationship between CV and mean response level is not linear. The stability of the CV is poor at very low mean values, and antigen-specific assays are often used to analyze data in a range where CV is non-linear. Consequently, Maecker and colleagues suggested using Standard Deviation (SD), which may be related linearly to the response mean, to compare the precision of different assays [24]. However, we did not find a clear linear correlation between SD and mean concentration (Additional file 8), and therefore we used %CV to compare precision of the different kits. Our results confirmed that the lower the secretion, the higher the %CV and that IL-5, IL-13 and IL-17A were difficult to quantify accurately even at the optimal time point, whatever the kit used. Another group has compared Luminex kits for the measurement of cytokines in supernatants collected from antigen-stimulated PBMC: they report good intra-plate but poor inter-plate precision of the Bio-Rad 17-plex kit [18] and found that the Millipore magnetic kit gave the most reproducible results [19]. In our hands, the good precision of Millipore kits was confirmed, as mean % CV of standards and samples from 2 different kits (10-plex versus 15-plex magnetic beads based kits) were similar.

We also used a “home-made” internal control to evaluate precision and reproducibility of Milliplex kits as suggested by De Jager and colleagues in their work with serum, plasma and whole blood culture supernatant to define the prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays [30]. We showed that the Millipore Milliplex kits demonstrated a good precision and reproducibility in our hands. Similarly, in their study of optimization and qualification of a multiplex bead array to assess cytokine and chemokine production by vaccine-specific cells, Defawe and colleagues found CVs for the intra-assay and inter-day variability below 30 % for all but one analyte with a Millipore kit [20].

Our study showed variability in the measurement of absolute cytokine concentration in supernatants from antigen-stimulated PBMC with Luminex kits coming from different manufacturers. A previous study showing that a Bio-Rad kit was more sensitive than an Invitrogen kit revealed the potential for differences in absolute cytokine concentration reported by these two kits [18]. Other studies also showed variability in the measurement of absolute cytokine concentrations in serum or plasma [13–16]. Possibly, the different capture and detection antibodies are the major causes of the differences in performance of multiplex kits from different manufacturers as well as the heterogeneity in analytes within each kit. Also, differences between the purified recombinant proteins used to generate the standard curves, and between assay buffers supplied by the manufacturers are likely to contribute to the divergent results, as well as cross-reactivities

observed with the Ozyme kit. Thus, the main criterion to select a manufacturer should be the availability of the panel of analytes that needs to be quantified and mixing data coming from different kits for analyses should be banned.

To determine positivity of samples, Defawe and colleagues used an empirical method based on their experience using the assay and they aimed to control the false positive rate below 3 % [20]. The first criterion was “minimum analyte concentration over background” determined for each analyte and the second criterion was “minimum fold increase over background concentration”. The minimum fold increase over background concentration criterion was set as three-fold for all analytes. We used the same second criterion in this study to calculate the SI, but the definition used for the first criterion is debatable because there is no consensus formula to determine the minimum analyte concentration over background.

### Conclusions

Here, we demonstrate that a protocol with a single round of stimulation but with two time points (day-2 and day-5) gave the optimal quantifications for different cytokines using 0.5 million PBMC per well, a cell quantity that gave the same level of specific cytokine secretion as 1.0 million. Millipore kits appear to be slightly more sensitive than those from Bio-Rad and Ozyme. However, we conclude that the panel of analytes that need to be quantified should be the main determinant of kit selection and that the same kit must be used throughout any given study. We also think that it is important to use the same batch number throughout the study to allow results to be compared between plates. To ensure the validity of the results, we also recommend the use of an internal control. Using this type of sample, we demonstrated that a 15-plex magnetic Milliplex kit displayed good precision and reproducibility. Moreover, our study suggests that particular attention should be paid to cell viability during cell culture to ensure that high cell mortality does not perturb the nature of cytokines secreted. Finally, to limit the variability inherent to cell culture, we suggest the use of supernatant pooled from at least three culture replicates to avoid large variations in the cytokine concentrations observed. In view of the cost of the technique and the good reproducibility of the results obtained with Millipore QC and with our internal control (intra- and inter-plate %CVs), it is unclear whether supernatant replicates are beneficial if standard curves are performed in duplicate and are extended to include lower levels so as to confirm the working range. In summary, our findings should help optimize assays for quantifying immune mediators during the course of disease or infection, or in response to vaccine or therapy.

## Methods

### Blood sample processing

Whole blood specimens were collected from two healthy controls (from the *Etablissement Français du Sang*, Créteil, France), seven HIV-seropositive patients (from the Mondor Hospital cohort, Créteil, France) and one TB-infected patient (from St-Louis Hospital, Paris, France). PBMC were isolated using LSM 1077 density gradient media (PAA), washed with PBS without calcium or magnesium (Life Technologies), frozen in fetal calf serum (FCS, PAA) containing 10 % DMSO (Sigma) and stored in liquid nitrogen. For each experiment, about  $12\text{--}18 \times 10^6$  PBMC (one cryovial) were thawed in R-20 (RPMI 1640 + glutamax containing 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Life Technologies) and 20 % FCS) medium and rested for 3 h at 37 °C, under 5 % CO<sub>2</sub> in R-10HS (RPMI 1640 + glutamax containing 100U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin and 10 % AB Human serum (HS, PAA)) medium. A minimal cell viability of 75 % as measured with an Auto 2000 cellometer (Nexcelom) after resting was required for use.

### PBMC stimulations

Two different protocols were used for PBMC stimulations. For the first one (2-step stimulation), PBMC ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated for 2 days at 37 °C, under 5 % CO<sub>2</sub> in a final volume of 300 µl R-10HS in 96 deep well plates (Greiner) with (i) 2 µg/ml of LIPO-5 vaccine composed of the clade B LAI HIV-1 Nef 66–97, Nef 116–145, Gag 17–35, Gag 253–284 and Pol 325–355 regions, coupled to a lipid tail [21]; (ii) 2 µg/ml of a mix of five long HIV-1 peptides (LP mix, NeoMPS) corresponding to the sequences included in the LIPO-5 vaccine without the lipid tail; (iii) 2 µg/ml of a pool of 36 HIV-1 15-mer peptides (NeoMPS) overlapping by 11 amino acids and spanning Nef, Gag and Pol sequences encoded by the LIPO-5 vaccine. Aliquots of 200 µl of supernatant were harvested on day 2, and 900 µl of fresh R-10HS medium containing 100 IU/ml human recombinant IL-2 (rIL-2, Miltenyi) was added. On days 4, 7 and 8, 500 µl of medium was replaced with fresh R10-HS medium containing 100 IU/ml rIL-2. On day 9, 800 µl of supernatant was discarded, cells were transferred in 96 V-bottom wells culture plates (Greiner), washed in PBS, resuspended in R-10HS medium containing the same concentrations of the corresponding antigens and incubated for 2 days at 37 °C, under 5 % CO<sub>2</sub> in a final volume of 200 µl R-10HS. Positive and negative controls consisted of PBMC cultured with 100 ng/ml of SEB (Sigma, only for the two last days of stimulation) and PBMC cultured in R-10HS alone (non-stimulated, NS), respectively. For the second protocol of PBMC stimulation (1-step stimulation), PBMC ( $0.5 \times 10^6$  or  $1 \times 10^6$ ) were stimulated for 1 to 7 days at 37 °C, under 5 % CO<sub>2</sub> in a final volume of 300 µl R-10HS in 96 deep well plates (Greiner) with: (i) 2 µg/ml

of LIPO-5 vaccine [21]; (ii) 2 µg/ml of LP mix (NeoMPS); (iii) 2 µg/ml of a pool of 36 HIV-1 15-mer peptides (NeoMPS) overlapping by 11 amino acids; (iv) 1 µg/ml of PPD (Statens Institute) and (v) 5 µg/ml of ESAT-6, a *Mycobacterium tuberculosis* T-specific antigen (Statens Institute). Positive and negative controls consisted of PBMC cultured with 10 ng/ml of SEB (Sigma) and PBMC cultured in R-10HS alone (non-stimulated, NS), respectively. Supernatants were harvested at days 2/11 for the re-stimulation (2-step) protocol and after various times of culture for the 1-step protocol. They were then frozen at -80 °C until assessment.

### Cytokine and chemokine assays with Luminex kits

All Luminex kits used for this study are described in detail in Table 1. Luminex reproducibility was evaluated using a Luminex kit developed and shared by the Baylor Institute for Immunology Research (BIIR, Dallas, TX, USA). This kit contained polystyrene beads from BIIR and Biolegend and standards from Biolegend. We used three Milliplex MAP kits from Millipore to optimize our stimulation protocol: a 11-plex human cytokine magnetic bead panel kit (#SPR137), a 10-plex human cytokine panel kit (#SPR171), and a 10-plex human Th17 magnetic bead panel. We compared the following commercial kits: one 16-plex magnetic Procarta Immunoassays kit (Affymetrix) from Ozyme; one 15-plex Milliplex MAP human cytokine magnetic bead panel kit (#SPR158) and one simplex Milliplex MAP human cytokine/chemokine magnetic bead panel, both from Millipore; one Bio-Plex Pro assays magnetic kit and one Bio-Plex Pro human Th17 cytokine assays kit, both from Bio-Rad. A 15-plex Milliplex MAP human Th17 magnetic bead panel (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) was selected for the last part of our study; precision was evaluated using intra- and inter-variability with Millipore QCs and an internal control (pool of SEB-stimulated PBMC supernatants from the two healthy donors). All samples were acquired on a Bioplex-200 instrument (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). All experiments were performed by the same operator according to the manufacturers' instructions.

### Statistical analysis

The concentration of each analyte was obtained by interpolating FI to a dilution standard curve over at least 7 dilution points supplied with the kit and calculated using a 5PL curve by the Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad). ICCs were used to assess reproducibility. The ICC is a measure of reliability, assessing the proportion of overall variability that is explained by the variability due to differences between samples [31]. Generally, reliability is considered to be good if the point estimate of the intra-class correlation coefficients is at least >0.7, and ideally > 0.8. ICCs were derived from linear mixed effects

models with a random effect for the intercept. The ICC was defined as the ratio of variance between supernatants to total variance. The assumption of Gaussian distributions of the residuals was verified. CVs (standard deviation over mean) were used to assess precision. A SI (calculated as a ratio between stimulated-cell supernatant concentration values and background concentration values) was used to reveal differences between the kits. All graphs were prepared using Microsoft Excel and GraphPad Prism. SAS (version 9.2, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) and GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software, La Jolla, California, USA) were used for statistical analyses.

### Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Intra-laboratory reproducibility with 11-day cultures. Results after 11-day cultures of PBMC from two representative HIV-infected patients (A and B, CD4 count > 500 mm<sup>3</sup>, HIV-1 RNA < 50 copies/ml) stimulated with LIPO-5 vaccine, a mix of 5 long HIV-1 peptides (LP mix), a pool of 15-mers HIV-1 peptides, or SEB as a positive control. IFN $\gamma$ , IL-5, and IL-17 polystyrene beads from Baylor Institute for Immunology Research, Texas, USA and Perforin beads from Biologend were used. Cultures were performed on three different days (black, green, blue) in triplicate for each day with 1.0 million PBMC per well. (PDF 110 kb)

**Additional file 2: Figure S2.** Intra-laboratory reproducibility with 2-day cultures. Results after 2-day cultures of PBMC from two representative HIV-infected patients (A and B, CD4 count > 500 mm<sup>3</sup>, HIV-1 RNA < 50 copies/ml) stimulated with LIPO-5 vaccine, a mix of 5 long HIV-1 peptides (LP mix), a pool of 15-mers HIV-1 peptides, or SEB as a positive control. IFN $\gamma$ , IL-5, and IL-17 polystyrene beads from Baylor Institute for Immunology Research, Texas, USA and Perforin beads from Biologend were used. Cultures were performed on three different days (black, green, blue) in triplicate for each day with 1.0 million PBMC per well. (PDF 110 kb)

**Additional file 3: PBMC viability over 7 days of culture.** PBMC Viability (%) from one healthy donor for two different experiments was determined by Acridine Orange/Propidium iodide (AOPI) staining with Auto 2000 cellometer (Nexcelom) with NS-, PPD (1  $\mu$ g/ml), or SEB (10 or 100 ng/ml)-stimulated PBMC for 1 to 7 days. (PDF 184 kb)

**Additional file 4: Figure S3.** Intra-assay precision of standards. %CVs concentration calculated using standard duplicates from Luminex magnetic kits from Ozyme, Millipore and Bio-Rad for the 16 cytokines common to all three kits. Mean %CVs for all cytokines are represented by red lines. (PDF 27 kb)

**Additional file 5: Figure S4.** Non-linear relationship between %CV and mean cytokine concentration. %CVs concentration (mean CVs for four different donors and four conditions [NS, PPD, SEB and ESAT-6 stimulations] calculated using culture triplicates for each of the 11 cytokines analyzed) plotted against corresponding mean concentrations for Ozyme, Millipore and Bio-Rad kits. (PDF 98 kb)

**Additional file 6: IL-22 cross-reactivity with Ozyme kit.** IL-22 concentration (pg/ml) determined with the three different kits in Millipore QC that do not contain this cytokine. (PDF 6 kb)

**Additional file 7: Intra- and inter-assay precision for Millipore QCs.** %CV concentration for each of the 13 plates calculated using Millipore QCs (QC1 = high and QC2 = low) duplicates for the selected 15-plex Millipore magnetic kit (see Material and Methods). IL-23 and IL-1 $\beta$  %CVs were not calculated due to concentration values < LLOQ and > ULOQ, respectively. Mean concentration values of Millipore QCs (QC1 = high and QC2 = low) duplicates (pg/ml) and %CVs of mean concentration calculated using the 13 inter-plates mean concentration values for the selected 15-plex Millipore magnetic kit (see Material and Methods section for detailed analytes). IL-23

and IL-1 $\beta$  %CVs were not calculated due to concentration values < LLOQ and > ULOQ, respectively. (PDF 252 kb)

**Additional file 8:** Absence of linear correlation between SD and mean concentration values. SD calculated using culture triplicates for NS, PPD- and SEB-stimulated PBMC from TB-infected patient plotted against IFN $\gamma$ , IL-5 and IL-17A corresponding mean concentration values for Ozyme, Millipore and Bio-Rad kits. (PDF 14 kb)

### Abbreviations

SPL: Five parameter log-logistic; CMV: Cytomegalovirus; CV: Coefficient of variation; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISpot: Enzyme-linked immunosorbent spot; ESAT-6: Early secreted antigenic target 6 kDa protein; FI: Fluorescence intensity; HIV: Human immunodeficiency virus; ICC: Intraclass correlation coefficient; LLOQ: Lower limit of quantification; LOQ: Limit of quantification; LP: Long peptides; NS: Non-stimulated; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PPD: Tuberculin purified protein derivative; QC: Quality control; SD: Standard deviation; SEB: Staphylococcal enterotoxin B; SI: Stimulation index; TB: Tuberculosis; Th: T-helper; ULOQ: Upper limit of quantification

### Acknowledgements

We thank Corinne Krief for blood processing and PBMC storage. We thank Sandra Zurawski from Baylor Institute for Immunology Research (BIR, Dallas, Texas, United States of America) for providing Luminex reagents and helpful discussion.

### Funding

This work was supported by the Investissements d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77, from the Agence Nationale de Recherche contre le Sida et les hépatites (Inserm-ANRS) and from FP7-Health-2009 on African-European Research Initiative in Co-infections of Poverty Related and Neglected Infectious Diseases. L. Richert received a PhD grant financed by Sidaction (<http://www.sidaction.org/>).

### Availability of data and material

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

### Authors' contributions

MS and CM carried out the immunoassays and drafted the manuscript and figures. LR participated in the design of the study and performed the statistical analysis. CL, SH, RT and YL conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Consent for publication

Not applicable.

### Ethics approval and consent to participate

All patients gave written informed consent (Ethics approval: CPP Ile de France IX n° 10-023).

### Author details

<sup>1</sup>INSERM, U955, Equipe 16, Créteil F-94010, France. <sup>2</sup>Université Paris Est, Faculté de médecine, Créteil F-94010, France. <sup>3</sup>Vaccine Research Institute (VRI), Créteil F-94010, France. <sup>4</sup>Université Bordeaux, ISPED, Centre INSERM U1219, F-33000 Bordeaux, France. <sup>5</sup>CHU de Bordeaux, pôle de santé publique, F-33000 Bordeaux, France. <sup>6</sup>INRIA SISTM, F-33405 Talence, France. <sup>7</sup>AP-HP, Hôpital H. Mondor – A. Chenevier, Service d'Immunologie Clinique et Maladies Infectieuses, F-94010 Créteil, France. <sup>8</sup>AP-HP, Hôpital H. Mondor – A. Chenevier, Service d'Immunologie Biologique, F-94010 Créteil, France.

Received: 6 June 2016 Accepted: 3 November 2016  
Published online: 11 November 2016

## References

- Price C, Newman D. Principles and practices of immunoassays. New York: Stockton; 1997.
- Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin Chem*. 2010;56:186–93.
- Fu Q, Zhu J, Van Eyk JE. Comparison of multiplex immunoassay platforms. *Clin Chem*. 2010;56:314–18.
- Chowdhury F, Williams A, Johnson P. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex® and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *J Immunol Methods*. 2009;340:55–64.
- Crabb Breen E, Reynolds SM, Cox C, Jacobson LP, Magpantay L, Mulder CB, et al. Multisite comparison of high-sensitivity multiplex cytokine assays. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18:1229–42.
- Prabhakar U, Eirikis E, Davis HM. Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP™ assay. *J Immunol Methods*. 2002;260:207–18.
- Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, Brandt JT, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;36:1037–44.
- Dossus L, Becker S, Achaintre D, Kaaks R, Rinaldi S. Validity of multiplexed-based assays for cytokine measurements in serum and plasma from « non-diseased » subjects: Comparison with ELISA. *J Immunol Methods*. 2009;350:125–32.
- Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantification of human cytokines in serum and culture supernatant. *Cytometry*. 2001;45:27–36.
- Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38:317–23.
- Carson RT, Vignali DAA. Simultaneous quantification of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods*. 1999;227:41–52.
- de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diag Lab Immunol*. 2003;10:133–9.
- Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;61B:35–9.
- Khan IH, Krishnan W, Ziman M, Janatpour K, Wun T, Luciw PA, et al. Comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009;76B:159–68.
- Chaturvedi AK, Kemp TJ, Pfeiffer RM, Biancotto A, Williams M, Munuo S, et al. Evaluation of multiplexed cytokine and inflammation marker measurement: a methodologic study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:1902–11.
- Nechansky A, Grunt S, Roitt IM, Kircheis R. Comparison of the calibration standards of three commercially available multiplex kits for human cytokine measurement to WHO standards reveals striking differences. *Biomark Insights*. 2008;3:227–35.
- Djoba Siawaya JF, Roberts T, Babb C, Black G, Golakaj HJ, Stanley K, et al. An evaluation of commercial fluorescent bead-based luminex cytokine assays. *PLoS One*. 2008;3:e2535.
- Berthoud TK, Manaca MN, Quelhas D, Aguilar R, Guinovart C, Puyol L, et al. Comparison of commercial kits to measure cytokine responses to *Plasmodium falciparum* by multiplex microsphere suspension array technology. *Malar J*. 2011;10:115.
- Moncunill G, Aponte JJ, Nhabomba AJ, Dobaño C. Performance of multiplex commercial kits to quantify cytokine and chemokine responses in culture supernatants from *Plasmodium falciparum* stimulations. *PLoS One*. 2013;8:e52587.
- Defawe OD, Fong Y, Vasilyeva E, Pickett M, Carter DK, Gabriel E, et al. Optimization and qualification of a multiplex bead array to assess cytokine and chemokine production by vaccine-specific cells. *J Immunol Methods*. 2012;382:117–28.
- Salmon-Céron D, Durier C, Desaint C, Cuzin L, Surenaud M, Ben Hamouda N, et al. Immunogenicity and safety of an HIV-1 lipopeptide vaccine in healthy adults: a phase 2 placebo-controlled ANRS trial. *AIDS*. 2010;24:2211–23.
- Lee JW, Weiner RS, Sailstad JM, Bowsher RR, Knuth DW, O'Brien PJ, et al. Method validation and measurement of biomarkers in nonclinical and clinical samples in drug development: a conference report. *Pharm Res*. 2005;22:499–511.
- Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISpot assays. *J Immunol Methods*. 2003;278:79–93.
- Maecker HT, Hassler J, Payne JK, Summers A, Comatas K, Ghanayem M, et al. Precision and linearity targets for validation of an IFN $\gamma$  ELISpot, cytokine flow cytometry, and tetramer assay using CMV peptides. *BMC Immunol*. 2008;9:9.
- Elsässer-Beile U, Von Kleist S, Gallati H. Evaluation of a test system for measuring cytokine production in human whole blood cell cultures. *J Immunol Methods*. 1991;139:191–5.
- Desombere I, Clement F, Rigole H, Leroux-Roels G. The duration of *in vitro* stimulation with recall antigens determines the subset distribution of interferon- $\gamma$ -producing lymphoid cells: a kinetic analysis using the interferon- $\gamma$  secretion assay™. *J Immunol Methods*. 2005;301:124–39.
- Lagrelus M, Jones P, Franck K, Gaines H. Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days. *Cytokine*. 2006;33:156–65.
- Belabani C, Rajasekharan S, Poupon V, Johnson T, Bar-Or A, on behalf of the CIHR/MSSC NET in Clinical Autoimmunity and The Canadian Pediatric Demyelinating Disease Network. A condensed performance-validation strategy for multiplex detection kits used in studies of human clinical samples. *J Immunol Methods*. 2013;387:1–10.
- Thiébaud R, Jacqmin-Gadda H. Mixed models for longitudinal left-censored repeated measures. *Comput Methods Programs Biomed*. 2004;74:255–60.
- de Jager W, Bourcier K, Rijkers GT, Prakken BJ, Seyfert-Margolis V. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol*. 2009;10:52.
- Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*. 1979;86:420–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



Mathieu SURENAUD

## Etude des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> induites chez l'homme par différentes stratégies vaccinales anti-VIH-1 utilisant des lipopeptides

### *Study of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses induced in humans by different anti-HIV-1 vaccination strategies using lipopeptides*

#### Résumé

Depuis les années 1990, l'ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites) a mis en place une stratégie de vaccination anti-VIH-1 originale fondée sur l'utilisation de peptides contenant des épitopes T couplés à une molécule lipidique et capables d'induire des réponses poly-épitopiques. Ces lipopeptides ont la particularité d'induire des réponses cellulaires sans nécessiter d'adjuvant via l'activation du TLR2 par l'acide palmitique composant la queue lipidique de ces lipopeptides qui permet également la cross-présentation d'épitopes T CD8<sup>+</sup> par les cellules dendritiques. Le candidat vaccin LIPO-5, constitué de 5 longs peptides (Gag 17-35, Gag 253-284, Nef 66-97, Nef 116-145, et Pol 325-355) comportant différents épitopes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> du VIH-1 de sous-type B couplés en position C-terminale à un acide monopalmitique via une lysine, est utilisé chez l'homme depuis bientôt 20 ans dans différents essais cliniques de phase I et II.

Lors de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude des réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> induites par les vaccins lipopeptidiques développés par l'ANRS et plus particulièrement sur le candidat vaccin LIPO-5, utilisé notamment dans les essais prophylactiques ANRS VAC 18 et VRI 01, et les essais thérapeutiques ANRS LIGHT et DALIA. Nous avons identifié et caractérisé les réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> post-vaccinales lors de l'essai DALIA et comparé ces réponses avec celles observées dans différents essais de vaccination thérapeutique et prophylactique menés par l'ANRS, utilisant des lipopeptides associés ou non à d'autres candidats vaccin (ALVAC, MVA et ADN).

Nous avons ainsi pu montrer que l'immunodominance de ces réponses n'était pas modifiée entre volontaires sains et patients infectés par le VIH-1. De plus nous avons montré que l'utilisation du candidat vaccin LIPO-5 en « prime » était particulièrement intéressante pour focaliser les réponses vaccinales sur les régions conservées du VIH-1 intégrées dans ce vaccin, et que le LIPO-5 chargé sur des cellules dendritiques induisait une meilleure immunogénicité, confirmant l'intérêt de ce vaccin pour la stratégie de « DC targeting » *ex vivo*. Enfin, nous avons également montré que la vaccination lipopeptidique permettait l'induction spécifique d'IL-13 par les LT CD4<sup>+</sup> et que cette réponse était associée à un faible rebond viral lors de la phase d'interruption de traitement de l'essai ANRS DALIA.

Ces résultats sont importants dans la quête de vaccins prophylactiques et thérapeutiques efficaces contre le VIH-1.

**Mots clés :** VIH-1, vaccin, lipopeptide, épitope, LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup>

#### Abstract

Since the 90's, the ANRS (France Recherche Nord&Sud Sida-HIV hépatites) has been committed to an original program combining basic science and clinical research developing an epitope-based vaccine strategy to induce a multi-epitopic cellular response against HIV-1 using lipopeptide vaccines. These lipid-conjugated peptides can induce cellular responses without adjuvant, because the palmitic acid compound of the lipid tail, which can also promote cross-presentation of CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes by dendritic cells, activates TLR2. LIPO-5 vaccine candidate, composed of HIV-1 Gag 17-35, Gag 253-284, Nef 66-97, Nef 116-145, and Pol 325-355 peptidic sequences containing different CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes from HIV-1 clade B linked to a monopalmitic acid via a lysine in C-terminus, is used in humans for nearly 20 years in different Phase I and II clinical trials.

During this work, we focused on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses induced by lipopeptide vaccines developed by the ANRS, in particular LIPO-5 vaccine candidate used in ANRS VAC 18 and VRI 01 prophylactic vaccine trials and ANRS LIGHT and DALIA therapeutic ones. We identified and characterized post-vaccination CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in DALIA trial and compared them to the responses observed in other therapeutic and prophylactic vaccine trials involving the use of lipopeptides either alone or in combination with other vaccine candidates (ALVAC, MVA, DNA).

We showed that immunodominance was not affected between healthy individuals or HIV-1-infected patients. Moreover, we showed that priming with LIPO-5 was very useful to focus T-cell responses to the HIV-1-conserved regions included in this vaccine candidate. In addition, we demonstrated that LIPO-5-loaded DC was the most immunogenic vaccine candidate, confirming the benefits of this vaccine candidate for *ex vivo* DC targeting. Last but not least, we also observed that lipopeptide vaccination induced IL-13 secretion by HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cells and that these IL-13 responses were associated with a lower viral rebound during the treatment interruption phase of the DALIA trial.

These results are important in the search for effective prophylactic and therapeutic HIV-1 vaccines.

**Key words:** HIV-1, vaccine, lipopeptide, epitope, CD4<sup>+</sup> T cell, CD8<sup>+</sup> T cell