



HAL
open science

Développement et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe de fusion de la protéine d'enveloppe du virus VIH-1

Reham Dawood

► **To cite this version:**

Reham Dawood. Développement et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe de fusion de la protéine d'enveloppe du virus VIH-1. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2011. Français. NNT : 2011STET003T . tel-00691542

HAL Id: tel-00691542

<https://theses.hal.science/tel-00691542>

Submitted on 26 Apr 2012

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.

UNIVERSITE JEAN MONNET DE SAINT ETIENNE

Thèse de Doctorat en

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Présentée par

Reham Mohammed Hassan DAWOOD

**Développement et caractérisation d'anticorps
monoclonaux dirigés contre le complexe de fusion
de la protéine d'enveloppe du virus VIH-1**

Soutenue le 26 Avril 2011 devant le jury composé de :

Dr Bernard VERRIER (Rapporteur)

Dr Andréa CIMARELLI (Rapporteur)

Pr Jean-Daniel LELIEVRE (Examineur)

Pr Thomas BOURLET (Examineur)

Pr Christian GENIN (Directeur de thèse)

Dr Stéphane PAUL (co-Directeur de thèse)

Mr Jean-Jacques PIN (Invité)

*Je dédie cette thèse à **ma mère**, ma source d'énergie et mon exemple de générosité et de courage. Je souhaite que cette thèse soit le fruit de ton amour, ta patience et ton éducation que tu m'as offerts.*

*A mes filles chéries, que j'aime de tout mon cœur. **Hana et Malak**, vous êtes la lumière qui illumine les jours sombres dans ma vie. Les mots sont faibles, j'espère que vous êtes fières de moi et que Dieu vous garde.*

REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail et surtout le Docteur Bernard VERRIER et le Docteur Andréa CIMARELLI qui ont été les rapporteurs de ma thèse et le Professeur Jean-Daniel LELIEVRE et le Professeur Thomas BOURLET qui en ont été les examinateurs et Mr Jean- Jacques PIN sans qui ce travail n'aurait pas pu être fait.

Je tiens à remercier très sincèrement le Professeur Christian GENIN qui m'a fait l'honneur d'être mon Directeur de thèse et qui m'a permis de réaliser ce travail. C'est grâce à lui que j'ai pu écrire ces lignes.

Je voudrais également exprimer mes remerciements sincères au Docteur Stéphane PAUL pour avoir encadré mon travail avec une grande rigueur scientifique. Ses précieux conseils m'ont donné de nouvelles pistes de réflexion.

Je tiens à remercier Nadine VINCENT pour m'avoir proposé ce projet de recherche, pour son encadrement au début de ma thèse et pour sa gentillesse qui a accompagné mes premiers pas dans le laboratoire.

Je souhaite remercier également le Professeur Bruno POZZETTO, Directeur du GIMAP, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Olivier DELEZAY pour son aide scientifique et ses nombreux conseils.

Un très grand merci à Blandine NOALLY, Fabienne JOSPIN, Agathe ANSINAS, Benjamin GARNIER, Françoise DUPLAT pour leur aide, leur soutien, leurs encouragements et surtout leur amitié.

Je tiens à remercier Nicolas ROCHEREAU pour son aide et son efficacité lors des difficultés logistiques que j'ai rencontrées surtout avec *Endnote*.

Je remercie les membres du GIMAP pour leur participation, leur soutien et leur amitié. Mes cordiales pensées à : Dorcaf, Imen, Kim Ann, Amandine, Ludovic, Hind, Fabrice, Fahd, Fauzia,

Françoise B, Julien, Pauline, Rafik, Rachel, Sandrine, Sévérine, Alexandre, Thibault, Viviana, Willy et Ximena.

Enfin, je remercie ma mère et mon frère qui ont su m'encourager à continuer mes études et sans qui je n'aurais sans doute pas trouvé la force de surmonter toutes les épreuves et les obstacles vécus.

J'aimerais aussi remercier l'état Egyptien qui a financé ma bourse pendant la durée de mon séjour en France.

Ces quatre années de thèse m'ont apporté beaucoup scientifiquement mais aussi sur le plan personnel. Elles resteront toujours gravées dans mon cœur.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
CCR5 : CC (deux cystéines) chémokine Receptor
CD : cellule dendritiques
CDR : Complementarity Determining Regions
CHO: Chinese hamster ovary
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CT : Cytoplasmic tail
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CXCR4 : CXC chemokine Receptor
FP: Fusion Peptide
HB: helix bundle
HPLC: High Performance Low Chromatography
HR1, HR2: Heptad repeat 1,2
HTLV: Human T-cell Leukemia Virus
IC50: Inhibitory Concentration of 50%
INF α , β , γ : interferon α , β , γ
Gp: Glycoprotéine transmembranaire
LTR: long terminal repeat en anglais
MPER: Membrane proximal external region
NF : Negative factor
NK : Natural Killer cell
NRE : Negative Regulatory Element
PCR: polymerase chain reaction
PID: Poly Immuno Dominant
RT : Reverse transcriptase ou transcriptase inverse
RE : Réticulum endoplasmique
SP : signal peptid
TAR: Tat-Activation-Response element
TH-1, 2 : T-helper 1,2
TM : transmembranaire

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

YAC : Yeast Artificial Chromosome

Table des matières

Résumé.....	5
Summary	6
INTRODUCTION.....	7
A – RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	9
1 - Le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH	10
1.1. Découverte du VIH et épidémiologie.....	10
1.2. Les rétrovirus.....	11
1.2.1. La famille des rétrovirus	11
1.2.2. Origine et diversité du VIH.....	14
1.2.3. Organisation de la particule virale	15
1.2.4. Organisation du génome.....	16
1.2.5. L'enveloppe virale.....	18
1.2.6. La glycoprotéine de surface, la gp120	21
1.2.7. La glycoprotéine transmembranaire, la gp41	22
1.3. Le cycle viral	24
1.4 – La variabilité du virus	26
1.4.1. Les mécanismes engendrant la variabilité.....	27
1.4.2. Les conséquences de la variabilité : le tropisme viral	27
1.4.3. La conversion phénotypique R5-X4	28
1.5. La réponse de l'hôte à l'infection virale.....	30
1.6. Les anticorps neutralisants	32
1.6.1. Les anticorps anti-gp120 et l'antigénicité de la gp120 :	32
1.6.2. Anticorps anti-gp41 et immunogénicité de la gp41	34
1.6.2.1 La région FP (peptide de fusion).....	35
1.6.2.2 Immunogénicité de la région N- terminale heptad repeat (N-HR) ou HR1	35

1.6.2.3 Immunogénicité de la boucle immunodominante ID.	36
1.6.2.4 Immunogénicité de la région C-terminale heptad repeat (C-HR)ou HR2...	36
1.6.2.5 Immunogénicité du complexe de fusion NHR-CHR.	36
1.6.2.6 Immunogénicité de la région MPER.	37
1.6.2.7 Immunogénicité de la région C-terminale et intracytoplasmique.	40
1.7. Les traitements	42
1.7.1. Les inhibiteurs d'entrée du virus.....	43
1.7.2. Inhibiteurs peptidiques	43
<i>1.7.2.1. Peptides dérivés du CD4</i>	43
<i>1.7.2.2. Peptides dérivés des chimiokines</i>	44
<i>1.7.2.3. Peptides dérivés de la gp41</i>	44
1.8. Les vaccins	47
1.8.1. Les vaccins inducteurs de l'immunité cellulaire	47
<i>1.8.1.1. Vaccin ADN</i>	50
<i>1.8.1.2. Cellules dendritiques « pulsées » par les antigènes</i>	51
1.8.2. Les vaccins inducteurs d'anticorps neutralisants	52
B – ETUDES EXPERIMENTALES	54
1 - Introduction.....	55
2 - La technique du phage display.....	56
2.1. Recherche des anticorps	56
2.2. Purification des IgG du sérum.....	56
2.3. Technique du phage display	57
<i>2.3.1. Protocole expérimental</i>	58
<i>2.3.2. Etude préliminaire</i>	61
3 - Les nouveaux objectifs	63

DISCUSSION	95
ANNEXE	103
Les techniques mises au point.....	103
1. La transfection des cellules	103
2. La production des anticorps monoclonaux.....	104
3. Le test de neutralisation.....	106
BIBLIOGRAPHIE	108

Résumé

La formation du complexe de fusion qui précède la fusion est essentielle à l'infection de la cellule-cible par le VIH-1. L'inhibition de la formation de ce complexe de fusion peut empêcher l'infection et représenter un moyen de traitement antirétroviral. Plusieurs équipes ont essayé de produire des anticorps neutralisants par immunisation de souris ou de lapins avec des peptides linéaires non conformationnels, mais sans résultat. L'élaboration d'une lignée de cellules eucaryotes exprimant la structure HR1-PID-HR2TM viral nous a permis de le faire. Cette lignée est un outil susceptible d'engendrer des anticorps monoclonaux (mAb). Trois mAbs contre le complexe de fusion de la région gp41 ont été produits chez la souris. L'activité neutralisante des anticorps produits a été évaluée sur des souches de laboratoires et des isolats primaires de VIH-1 de clades B et C. Ils induisent des réponses neutralisantes à large spectre. Les résultats obtenus montrent aussi que les trois anticorps monoclonaux pouvaient inhiber la formation de syncytia et bloquer l'interaction entre les structures HR1 et HR2.

Summary

Envelope glycoprotein is the primary target for human immunodeficiency virus (HIV) vaccine design. The N-terminal and the C-terminal regions of the gp41 interact with each other to form six helix bundle which is responsible for the fusion between the viral membrane and the target cell membrane. Monoclonal antibodies that disrupt the formation of the six helix bundle inhibit the HIV fusion. During the last decade, several human monoclonal antibodies of potent antiviral capacity for neutralizing primary isolates of different clades have been developed. The most broadly neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) were screened from HIV-1 seropositive patients and recognized linear epitopes within the membrane proximal region of gp41. In this study, we developed a stable transfected eucaryot cell line expriming a well folded complex. Three mAbs against HIV-1 gp41 were prepared in mice. Our results show that the three mAbs were able to neutralize and inhibit the HIV-1 infection. Two of the mAbs bound to the recombinant folded gp140 and recognized HR1/HR2 regions while one of them recognized linear epitope within the HR2. Interestingly, the results showed that the three mAbs could inhibit the syncytium formation and block the interaction between the HR1 and the HR2 region.

INTRODUCTION

L'infection par le VIH-1 se déroule en plusieurs étapes commençant par l'interaction entre la sous-unité gp120 de la protéine d'enveloppe (gp160) du virus et le récepteur CD4 de la cellule cible. La fixation du virus sur le CD4 de la cellule engendre un changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe qui devront se fixer sur un ou plusieurs co-récepteurs cellulaires (CXCR4 ou CCR5)(121).

La gp41 est activée dans le processus et par un changement conformationnel et provoque la fusion de l'enveloppe lipidique du virus avec la membrane plasmique de la cellule-cible. Le complexe de fusion établit un contact avec la membrane-cible et les deux structures HR1 et HR2 interagissent pour former un complexe de 6 sous-unités en hélice α (3 pour chaque) et permet le rapprochement de l'enveloppe du virus et de la cellule-cible (30, 41).

L'accessibilité de ces domaines reste transitoire pendant le processus de fusion. C'est la raison pour laquelle les anticorps dirigés contre ces domaines ne sont pas générés lors de l'infection naturelle et jusqu'à présent aucun anticorps naturel n'a été identifié.

Les régions de la protéine d'enveloppe impliquées dans le processus de fusion sont bien conservées parmi les souches VIH-1. Des anticorps neutralisants ont été produits contre le complexe de fusion (34, 57, 86, 137). Il a été démontré que certains anticorps monoclonaux reconnaissent mieux le complexe HR1/HR2 que les deux régions HR1 et HR2 séparées (23, 57, 137).

Des efforts considérables sont actuellement déployés pour développer de nouveaux agents antiviraux capables de bloquer l'entrée du VIH. L'approche la plus prometteuse pour combattre le VIH est le blocage de la fusion par le développement d'un vaccin.

Nous avons préparé des immunogènes, le complexe HR1-PID-HR2 *TM VIRAL* et le complexe HR1-PID-HR2 *TM vecteur* exprimés d'une manière stable à la surface de cellules eucaryotes (lignée HEK 293). La présentation des complexes est bien conformationnelle et glycosylée. Les lignées ont été identifiées par les anticorps monoclonaux anti-gp41. Ces lignées sont des outils très intéressants, susceptibles de faire produire des anticorps.

Des anticorps monoclonaux ont été obtenus après fusion à partir de souris immunisées. Les anticorps produits sont capables de reconnaître la gp41.

Trois anticorps sont neutralisants à large spectre sur des clades B, C (souches du laboratoire et souches primaires).

Par cartographie réalisée pour étudier les épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux produits, on a observé qu'un des trois anticorps reconnaît un épitope linéaire localisé dans la région C-terminale de la gp41 et les deux autres anticorps reconnaissent des épitopes conformationnels localisés dans le complexe de fusion HR1/HR2 de la gp41.

Les anticorps ont été testés en fonction de leur capacité à inhiber la fusion cellulaire entre les cellules CHO-WT qui expriment la glycoprotéine d'enveloppe et les cellules Hela-CD4 qui expriment le CD4. Les trois anticorps ont été capables d'inhiber la fusion cellulaire.

Les propriétés des anticorps à inhiber la formation du complexe ont été étudiées par un test ELISA. Les trois anticorps sont capables d'inhiber l'interaction entre le HR1 et le HR2 en interférant avec le mécanisme de fusion.

A – RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1 - Le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH

1.1. Découverte du VIH et épidémiologie

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) appartient à la famille des rétrovirus. Ce sont des virus enveloppés qui possèdent un génome à ARN monocaténaire diploïde. Leur particularité est de posséder une transcriptase inverse, enzyme qui permet la transcription de l'ARN viral en molécule d'ADN complémentaire bicaténaire, capable de s'intégrer à l'ADN de la cellule-cible. Depuis sa découverte l'épidémie de SIDA a évolué dramatiquement, majoritairement en Afrique et en Asie et à ce jour aucun vaccin efficace n'est disponible. Dans le bilan 2007, de l'ONUSIDA, il a été estimé que le nombre de personnes infectées par le VIH dans le monde est de 33 millions, avec 2,7 millions de nouvelles infections et 2 millions de décès dans l'année. L'Afrique sub-saharienne est de loin la région du monde la plus touchée avec 22 millions de personnes infectées, suivie par l'Asie du Sud et du Sud-Est avec 4,2 millions. Le poids de l'épidémie dans un pays s'exprime par la proportion de personnes infectées dans l'ensemble de la population (ou prévalence). Elle varie fortement d'un pays à l'autre (Figure 1), le maximum étant atteint en Afrique australe : plus de 15 %. Au niveau mondial, la prévalence du VIH parmi les personnes âgées de 15 à 49 ans semble stagner depuis 2002. Toutefois, en raison de la croissance démographique, le nombre absolu de personnes vivant avec le virus continue d'augmenter. (UNAIDS 2008).

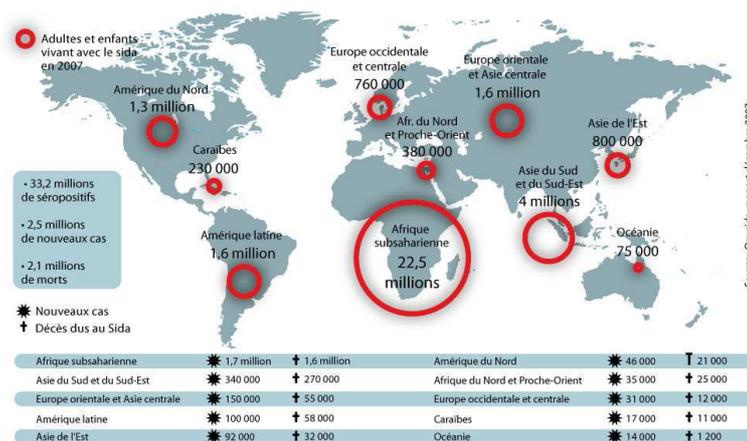


Figure 1 : Répartition du nombre de séropositifs dans le monde en 2008. UNAIDS 2008.

1.2. Les rétrovirus

1.2.1. La famille des rétrovirus

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) appartient à la famille des rétrovirus. Ils sont définis principalement par leur mode de réplication: leur génome constitué d'ARN, est transcrit en ADN grâce à une enzyme qui est la transcriptase inverse (ou RT). La famille des rétrovirus, largement répandue parmi les diverses espèces animales, est divisée en trois sous-familles selon des critères de pathogénie, et de paramètres phylogénétiques, il existe deux types de rétrovirus :

- **les virus exogènes** : ceux-ci ne sont pas présents naturellement dans l'organisme récepteur : ils vont devoir infecter les cellules de celui-ci pour pouvoir se dupliquer. Ces virus sont classés en deux sous-familles, **les orthoretrovirinae** et **les pumaretrovirinae** ; eux-mêmes comportent au total sept genres : Alpha rétrovirus, Béta rétrovirus, Gamma rétrovirus, Delta rétrovirus, Epsilon rétrovirus, Lentivirus et Spumavirus.

Les cinq premiers, les plus anciennement connus et les plus répandus (appartenant à la sous-famille orthoretrovirinae) sont associés à des tumeurs et à des leucémies. Cette sous-famille comprend les HTLV ou Human T-Cell Leukemia Virus identifiés à la fin des années 1970 chez des malades atteints de leucémie T ou d'un lymphome cutané (RTLTV-1) puis chez un patient présentant une leucémie à tricholeucocytes (HTLV-2). On les appelle par conséquent des oncovirus.

Les lentivirus sont caractérisés par l'apparition de maladies comme les pneumonies et les désordres neurologiques et par leur pouvoir cytopathogène en culture. Les HIV (Human Immunodeficiency Virus) ou VIH, agents responsables du SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise) font partie des lentivirus. Actuellement, deux types de virus ont été identifiés: le VIH-1, répandu sur tous les continents et responsable de la pandémie, et le VIH-2, principalement présent en Afrique de l'Ouest. Les lentivirus infectent principalement les macrophages et les lymphocytes T CD4+. Ces infections lentivirales résistent au système immunitaire et induisent généralement des immunodéficiences sur des périodes relativement longues. Un caractère distinctif de cette sous-famille, particulièrement pour le VIH, consiste en leur capacité à infecter des cellules quiescentes et/ou en différenciation terminale et de réduire l'expression de leurs protéines dans les

cellules infectées établissant un état de latence. Ce dernier peut persister sur une longue période jusqu'à la réactivation du virus lors d'une réponse cellulaire. Par conséquent, l'existence de ces cellules-réservoir représente l'un des principaux obstacles à l'éradication du virus VIH chez les patients sous thérapie antirétrovirale.

Les spumavirus sont des virus retrouvés chez de nombreux mammifères mais ne sont associés à aucune pathologie connue chez l'homme et l'animal.

- **Les virus endogènes** : les ERV (endovirus rétrovirusés), sont des rétrovirus dont le génome est intégré dans celui de l'espèce qui fut jadis infectée. Ils ont été découverts lors du séquençage du génome humain et il apparaît que tous les organismes eucaryotes possèdent dans leur génome, des séquences très similaires à des ERV. Ils ne s'expriment plus et sont à priori non pathogènes, bien que l'on soupçonne certains d'entre eux d'être à l'origine de certaines maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaques.

Tableau 1 : classification des rétrovirus

Genre	Exemples
Alpha rétrovirus	Avian Leukosis Virus Avian Erythroblastosis Virus Avian Myeloblastosis Virus Avian Myelocytomatosis Virus Rous Sarcoma Virus
Béta rétrovirus	Mouse Mammary Tumor Virus Simian Type D Retrovirus (Simian AIDS-related virus ,SRV) Ovine Pulmonary Adenocarcinoma Virus Squirrel Monkey Retrovirus
Gamma rétrovirus	Murine Leukemia Virus Feline Leukemia Virus Porcine Type C Oncovirus Feline Sarcoma Viruses Murine Sarcoma Virus Woolly Monkey Sarcoma Virus Avian Reticulendotheliosis Virus
Delta rétrovirus	Bovine Leukemia Virus Human T-lymphotropic Virus 1 Human T-lymphotropic Virus 2 Simian T-lymphotropic Virus
Epsilon rétrovirus	Walleye Dermal Sarcoma Virus
Lentivirus	Visna/Maedi virus Caprine Arthritis Encephalitis Virus Equine Infectious Anemia Virus Bovine Immunodeficiency Virus Feline Immunodeficiency Virus Primate Lentiviruses (HIV-1, HIV-2, SIV)
Spumavirus	Human Spumavirus Simian Foamy Virus Bovine Syncytial Virus Feline Syncytial Virus

1.2.2. Origine et diversité du VIH

Il existe deux types de VIH : le VIH-1, à l'origine du SIDA et le VIH-2, responsable d'un syndrome d'immunodéficience se développant lentement (9). Ils se différencient par rapport à leur origine géographique, l'organisation de leur génome et la relation phylogénétique qu'ils ont avec les autres lentivirus de primates dont ils sont tous les deux issus. Le VIH-1 se caractérise par une grande variabilité génétique. Les souches de virus peuvent être classées en trois groupes :

- Le groupe M (Main), majoritaire, regroupe onze sous-types de VIH (A à K) classés en fonction de leurs séquences virales (85), le B étant le plus répandu en France et le C prédominant au niveau mondial
- Le groupe O (Outlier), très rare, retrouvé au Gabon et au Cameroun
- Le groupe N (Non-M et Non-O), également rare, identifié au Cameroun.

Antigéniquement distinct du VIH-1, mais également moins pathogène, le VIH-2 a une diffusion actuellement restreinte à l'Afrique de l'Ouest.

1.2.3. Organisation de la particule virale

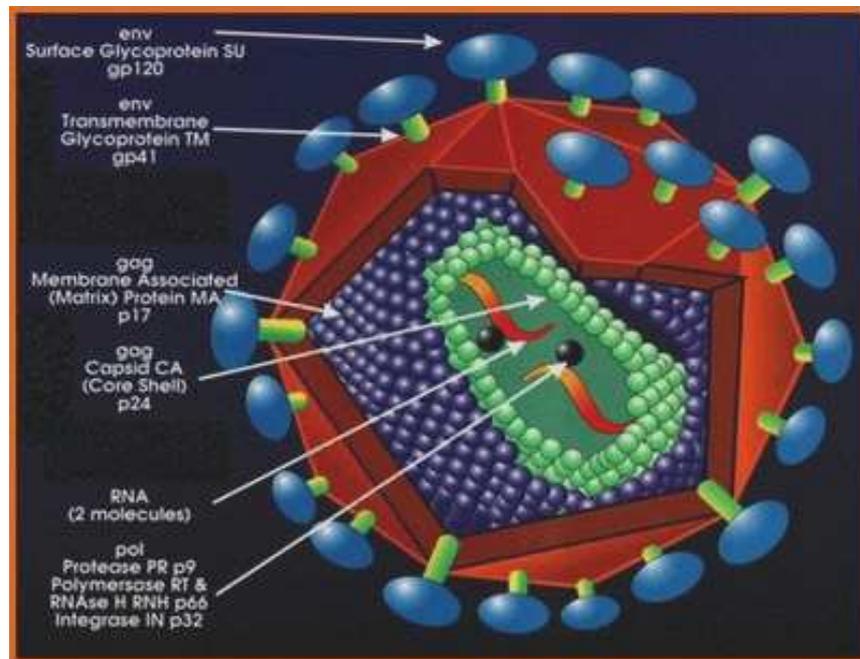


Figure 2 : Structure du VIH

www.bioquest.org/bedrock/problemspaces/hiv/.

Le VIH (Figure 2) possède une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte infectée. La surface de cette enveloppe est recouverte de complexes protéiques, responsables de l'attachement du virus sur les cellules hôtes. Il s'agit de spicules formés par l'association non covalente de deux glycoprotéines, gp120 et gp41, présentes sous forme de trimères (156). La protéine gp120 se fixe aux récepteurs cellulaires tandis que la gp41 est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire. Ces deux protéines sont codées par le gène env (enveloppe), sous la forme de gp160, une protéine précurseur qui sera glycosylée puis clivée en gp41 et gp120. La face interne de l'enveloppe est tapissée d'une couche de la protéine P17 codée par le gène gag (groupe specific antigen) constituant la matrice.

Le cœur du virion renferme deux copies d'ARN viral, protégées par une capsid formée par l'assemblage des protéines p24, autre produit du gène gag. Associées aux molécules d'ARN, on trouve de nombreuses protéines virales impliquées dans le processus d'encapsidation du matériel

génétique au cours du cycle viral (p7) voir aussi nécessaires à l'infection virale d'une cellule hôte. C'est l'exemple de la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéine virale R.

1.2.4. Organisation du génome

Le VIH est un virus enveloppé (80 à 120 nm de diamètre), dont la nucléocapside contient un génome viral diploïde constitué de deux ARN monocaténares de polarité positive ainsi que des enzymes virales. Le génome du VIH (9,2 kb) est composé de trois gènes caractéristiques des rétrovirus : gag, pol, env (117, 143). Le gène gag code pour les protéines structurales qui sont clivées après traduction du précurseur Gag. Le gène pol (polymerase) code pour les différentes enzymes virales : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) (53). Le gène env (enveloppe) code pour les glycoprotéines d'enveloppe de surface SUgp120 et transmembranaire TMgp41 (Figure 3).

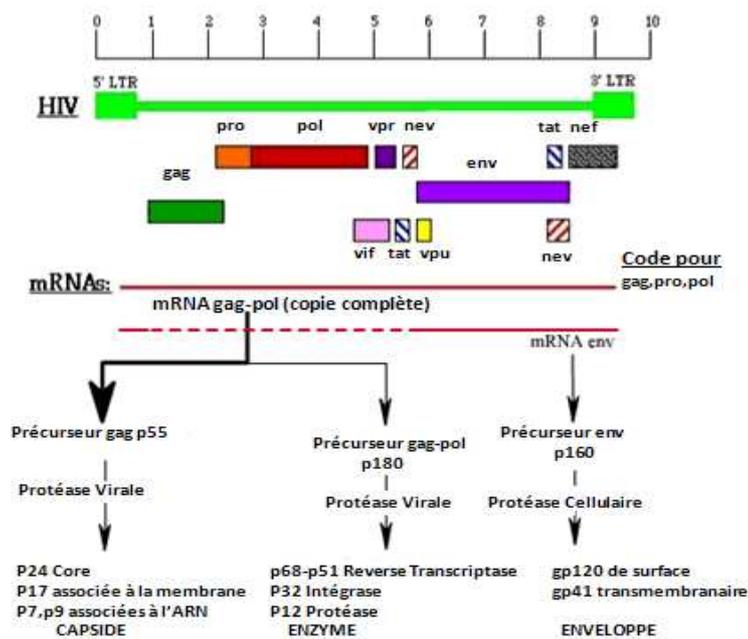


Figure 3 : Le génome contient, en plus des trois gènes structuraux gag, pol, env, six gènes supplémentaires tat, rev, nef, vif, vpu, vpr (d'après Wain-Hobson S. et al, Cell, 1985).

Les six gènes supplémentaires interviennent dans la régulation du cycle viral ou dans le pouvoir infectieux des virions. Les gènes ont des phases de lecture chevauchantes (12). Ces six gènes codent des protéines régulatrices :

- Tat (trans-activator of transcription, p15) s'accumule dans le noyau cellulaire où il joue le rôle de trans-activateur de la transcription virale.
- Vpr (viral protein regulatory, p15) est associée à la nucléocapside où elle présente un signal de localisation nucléaire nécessaire à l'importation du complexe de pré-intégration dans le noyau. Vpr permet également d'arrêter le cycle viral en phase G où la réplication virale est très efficace (71).
- Vpu (viral protein unknown, p16) forme des complexes oligomériques au niveau de la membrane cellulaire où elle inhibe l'expression du récepteur CD4. Elle inhibe aussi l'expression de HLA-1, ce qui protège les cellules infectées vis-à-vis de la réponse immunitaire cellulaire (37).
- Rev (regulator of viral expression, p20) se retrouve dans le noyau cellulaire. Il permet l'exportation des ARNm du noyau codant les protéines de structure. En conséquence il augmente l'expression de ces protéines de structure et effectue une régulation négative sur les ARNm de petite taille codant les protéines de régulation.
- Vif (virion infectivity vector, p23) est indispensable à la réplication du VIH dans certaines cellules-cibles (lymphocytes, macrophages) et à son infectivité.
- nef (negative factor, p27) agit sur de nombreuses protéines cellulaires. Il inhibe l'expression de CD4 qui favorise la libération des virions(79) .

Deux séquences promotrices répétées, communément appelées LTR (Long Terminal Repeat), bordent les extrémités du génome viral. Ces séquences contiennent plusieurs sites actifs reconnus par la protéine virale Tat et divers facteurs de transcription cellulaires, lesquels modulent la transcription du VIH-1. Trois régions nommées U3 (nucléotide (nt) -454 à -1), R (site d'initiation à +60) et U5 (nt +60 à +181) (figure 3) composent le LTR (118). Elles contiennent quatre domaines fonctionnels responsables de la transcription du VIH-1 : la région TAR (de l'anglais *Tat-Activation-Response element*) se situant en aval du site d'initiation (nt +1 à +60), la région promotrice contenant la boîte TATA (nt -78 à -1), la région amplificatrice (nt -105 à -79) et la

région modulatrice (nt - 454 à -104). Cette dernière contient une région nommée NRE (Negative Regulatory Element) régulant négativement la transcription virale (125). Ces régions (promotrice, amplificatrice et modulatrice) contiennent divers sites consensus de liaison à certains facteurs de transcription cellulaire, notamment NF- κ B. C'est pourquoi l'activation de ces facteurs de transcription, par des agonistes cellulaires, influence la transcription du VIH-1. Les sites consensus présents dans le LTR sont illustrés dans la figure 3.

Tableau 2 : Rôle des protéines virales

gag (Group-Specific Antigen)	Protéines de structure
pol (polymérase)	Transcriptase inverse, protéase, intégrase
Env (enveloppe)	Gp120 : attachement/gp41 : fusion
tat (Transactivator)	Régulateur positif de la transcription
Rev (Regulator of Viral Expression)	Export des transcrits non épissés hors du noyau
Vif (Viral Infectivity)	Empêche la désamination de l'ADN viral en liant la protéine antirétrovirale APOBEC3G
vpr (Viral Protein R)	Transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire
vpu (Viral Protein U)	Réduit l'expression du CD4
nef (Negative-Regulation Factor)	Augmente l'infectivité et réduit l'expression

Le tableau résume les fonctions de chacune des protéines virales dans le cycle répliatif du VIH-1.

1.2.5. L'enveloppe virale

L'analyse par rayons X montre deux classes structurales différentes de glycoprotéines virales. Les glycoprotéines de classe II sont constituées de trois domaines principalement repliés en feuillets bêta, « couchés » sur l'enveloppe virale. Cette classe contient les protéines de fusion de deux membres des familles Togaviridae, et Flaviviridae : les alphavirus et les flavivirus (73). Les protéines virales de classe I présentent une structure différente. Elles sont majoritairement

hélicoïdales. Par les analyses cristallographiques, les glycoprotéines virales de classe I ont deux structures correspondant à la conformation pré-fusion et post-fusion. Sous la conformation pré-fusion, les hélices C-terminales des trois monomères interagissent ensemble pour former un trimère d'hélices. Ce trimère d'hélices C-terminales peut être entouré par les hélices N-terminales. Par contre, sous la conformation post-fusion, ce sont les hélices N-terminales qui interagissent ensemble et sont entourées par les hélices C-terminales. Cette différence structurale frappante entre les deux états révèle que les glycoprotéines de classe I subissent un changement de conformation lors de la fusion virale (126). Il a été démontré que la structure post-fusion est plus stable d'un point de vue thermodynamique que la structure pré-fusion. L'énergie libre lors du changement de conformation induirait la fusion membranaire (19).

Les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 forment un complexe de fusion membranaire de classe I (30). La gp120 contient le domaine de liaison lui permettant de s'associer au récepteur CD4 et au corécepteur (récepteur de chimiokines, CCR5 ou CXCR4) sur la cellule cible (53)-(7)-(32)-(35). La gp41 contient le domaine de trimérisation. Elle est aussi responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire (Figure 4) (22, 51, 145).

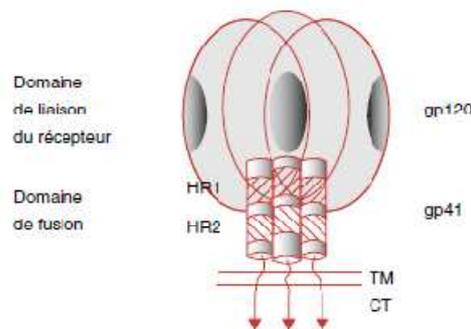


Figure 4 : Organisation du complexe de fusion membranaire de classe I. Protéines virales du complexe de fusion membranaire de classe I du VIH-1 comprenant le domaine de liaison au récepteur (gp120) et le domaine de fusion et d'oligomérisation (gp41) avec l'ancre transmembranaire (TM) et la queue cytoplasmique (CT). En gris foncé, sites de liaison du CD4. Les répétitions d'heptapeptides contigus HR1 et HR2 sont hachurées. (d'après Pancera M. J. Virol, 2005).

Etant donné leur disposition à la surface du virus, ces protéines sont les cibles principales des anticorps neutralisants et sont donc étudiées intensément pour leur possible utilisation en tant

qu'immunogènes dans des préparations vaccinales. La glycoprotéine d'enveloppe est initialement synthétisée sous la forme d'un précurseur protéique fortement glycosylé d'environ 845 à 870 acides aminés, appelé gp160 (Figure 5). Cette protéine est oligomérisée dans le réticulum endoplasmique et subit des étapes de glycosylation dans l'appareil de Golgi (75). Elle est ensuite clivée par des protéases cellulaires en deux protéines, la gp120 et la gp41 (94). Les glycoprotéines restent associées par des liaisons non covalentes et sont transportées vers les membranes où elles sont incorporées dans les virions lors du bourgeonnement.

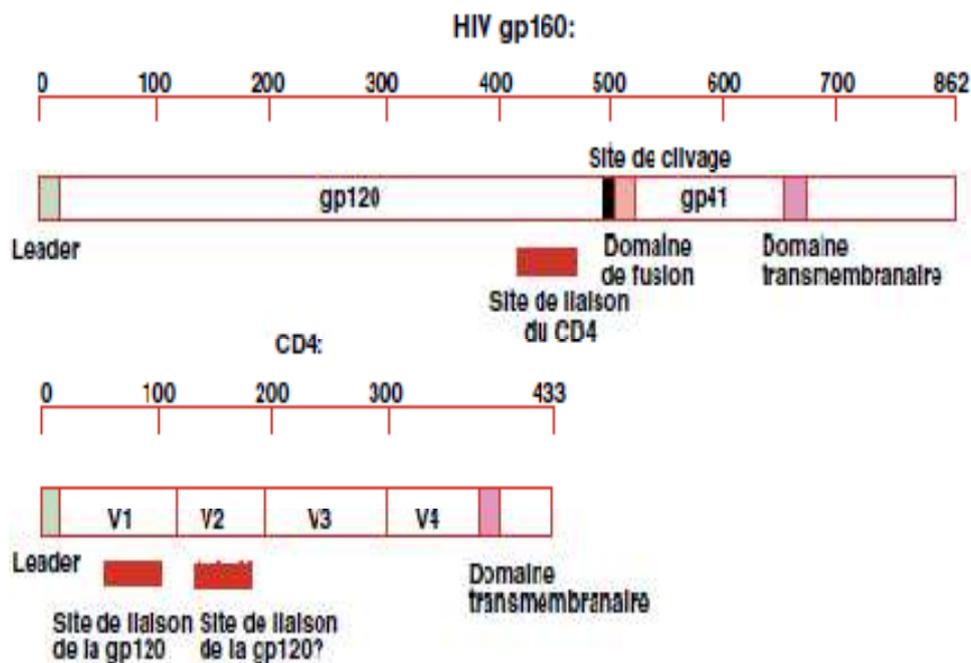


Figure 5 : Organisation structurale des protéines *env* et *CD4*. Les régions impliquées dans la liaison gp120-CD4 sont indiquées en rouge. L'échelle indique la numérotation des acides aminés (d'après Chan et al, Cell, 1997).

1.2.6. La glycoprotéine de surface, la gp120

La glycoprotéine de surface gp120 est composée d'environ 480 acides aminés et 9 ponts disulfures. Elle contient 20 à 24 sites de N-glycosylation qui contribuent à la moitié de sa masse moléculaire (76) (Figure 6). Elle est organisée en cinq régions constantes dont les séquences sont semblables pour les différentes souches virales (C1-C5) et cinq régions variables qui diffèrent considérablement. Celles-ci sont appelées boucles variables (V1-V5) (132). Les régions variables V1-V4 sont ancrées à leur base par des ponts disulfures et masquent les sites de liaison du récepteur CD4 et des corécepteurs, CXCR4 ou CCR5.

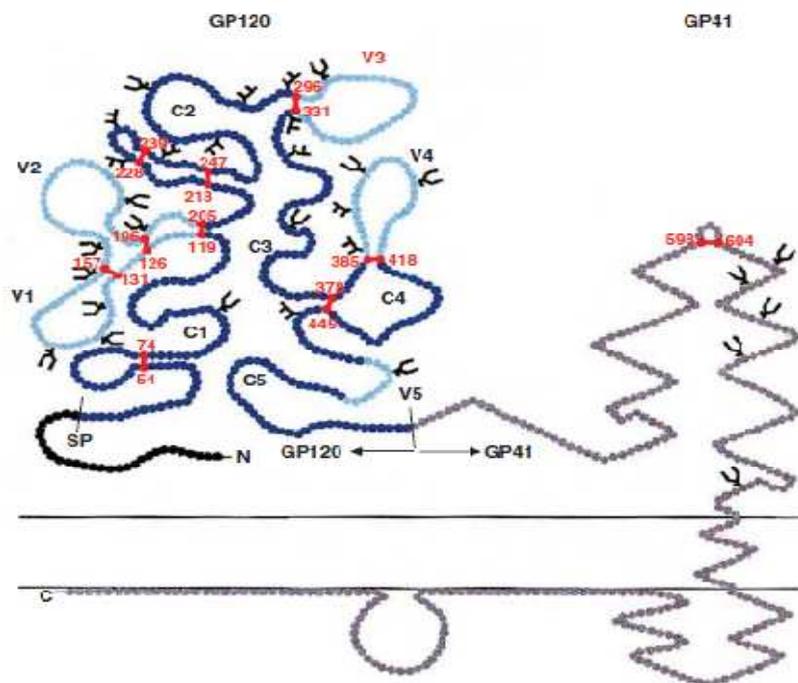


Figure 6 : Représentation schématique du précurseur gp160. Le peptide signal est indiqué en noir (SP). La glycoprotéine de surface gp120 est indiquée en bleu, les régions conservées en bleu foncé (C1-C5) et les boucles variables en bleu clair (V1-V5). La glycoprotéine transmembranaire gp41 est représentée en gris et contient une boucle formée par un pont disulfure. Les sites de glycosylation des chaînes mannosidiques (F) et des chaînes glycosidiques complexes (Y) sont indiqués. Les résidus cystéine sont numérotés et indiqués en rouge, ainsi que les ponts disulfures (d'après Land A. et al, Bioch. 2001).

1.2.7. La glycoprotéine transmembranaire, la gp41

La protéine transmembranaire gp41 est composée de 340 acides aminés dont environ 180 forment l'ectodomaine qui contient quatre sites de N-glycosylation et un pont disulfure, responsable de la formation d'une petite boucle (Figure 7-A). La gp41 comprend un domaine externe (ectodomaine) qui contient deux régions de répétition d'heptapeptides contigus, HR1 et HR2 (Figure 6). HR1, qui contient l'hélice appelé N36 qui est responsable de la trimérisation de la protéine. En effet, la détermination de la structure aux rayons X de l'ectodomaine de la gp41 indique que la glycoprotéine existait dans une configuration de trimère. Il a été montré que les hélices α de la région HR1 (N-terminale, hélice N36) de la gp41 interagissent par les positions *a* et *d* des heptapeptides pour former un trimère central. Ce type d'arrangements est spécifique des structures en faisceau d'hélices torsadées (*coiled-coils*), caractérisées par des répétitions d'heptapeptides contigus (abcdefg)_n avec une prédominance de résidus hydrophobes aux positions 1 et 4 (*a* et *d*) et des résidus chargés aux positions 5 et 7 (*e* et *g*). Dans le cas d'un faisceau d'hélices torsadées trimérique, comme pour la gp41, le résidu *a* d'un faisceau interagit avec le résidu *d*' du troisième. Le résidu *a*' du troisième interagit avec le résidu *d*' du deuxième, et le résidu *a*' interagit avec le résidu *d* du premier pour former un trimère (Figure 7C). Dans la structure « postfusion » de la gp41, les régions HR2 viennent se positionner de façon antiparallèle dans les sillons du faisceau d'hélices torsadées trimérique formé par HR1 (Figure 7D et E). Ces régions sont impliquées dans la fusion des membranes virales et cellulaires. Par ailleurs, la gp41 contient une ancre transmembranaire et une queue cytoplasmique contenant des motifs variés qui contribuent à la réplication virale (81) (Figures 6 et 7).

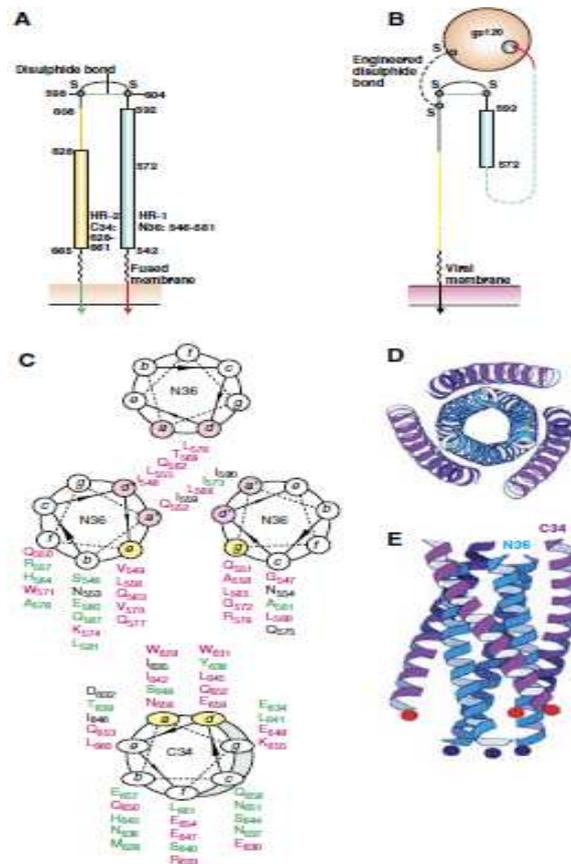


Figure 7 : Structure et fonctions de la gp41. **A.** Double-hélice de la glycoprotéine gp41. Les rectangles indiquent les hélices α . L'intérieur de l'hélice est formé par trois copies du segment bleu (HR1, N36) et le domaine externe par le segment jaune (HR2, C34). La structure secondaire comprend un feuillet β (résidus 608-627) et des hélices α (résidus 628-665). Les flèches rouges et vertes correspondent respectivement au peptide de fusion et à l'ancre membranaire. **B.** Représentation schématique de la structure méta-stable (avant fusion) du complexe gp120-gp41. Une seule chaîne de trimère est représentée. Le pont disulfure introduit dans l'étude de Binley *et al.* est indiqué en noir. L'hélice centrale s'arrêterait au résidu glycine 572 et ferait face au domaine de la gp120 où le peptide de fusion (en rouge) est inséré. Dans cette configuration de préfusion, les régions HR2 ne sont pas organisées (ligne jaune interrompue) mais sont dirigées vers l'ancre transmembranaire (noir). **C.** Représentation schématique des hélices N36 et C34 des régions HR1 et HR2 de la gp41 : formation du faisceau d'hélices torsadées trimériques (*coiled-coil*) et du faisceau de six hélices (HR1 et HR2). Trois hélices N36 et une hélice C34 sont représentées, vues du haut du complexe. Les résidus à chaque position sont colorés en fonction de leur conservation entre les séquences du VIH1 (HXBc2) et du SIV (mac239) : rose, résidus identiques ; noir, résidus analogues ; vert : résidus non conservés. Les hélices N36 interagissent aux positions *a* et *d* (rose) pour former le faisceau d'hélices torsadées trimériques. Lors de la formation du faisceau des 6 hélices (juste avant la fusion), chaque hélice C34 se positionne dans les sillons formés par deux hélices N36, légèrement penchée vers l'hélice N36 gauche en haut du complexe et vers l'hélice N36 droite en bas du complexe

(représentée par l'ombre). Les résidus de contact entre les hélices N36 et C34 sont indiqués en jaune. **D.** Structure de la glycoprotéine d'enveloppe gp41 : vue du haut du complexe des hélices N36 et C34 selon la symétrie d'ordre 3 du trimère. Les hélices α du trimère central sont indiquées en bleu (HR1, N-terminale) et les hélices α de la région HR-2, C-terminale sont indiquées en violet. **E.** Structure de la glycoprotéine d'enveloppe gp41 : vue du complexe par le côté. Les sphères bleues indiquent les points de contact du peptide de fusion et les sphères rouges ceux de l'ancre transmembranaire. Les hélices α du trimère central sont indiquées en bleu (HR1/N-terminale, N36) et les hélices α des régions HR2 (C-terminale, C34) en violet. (d'après Chen Ch. et al. Aids Res Hum Retrovirus, 2000 and Berger EA. et al. Nature 1998).

1.3. Le cycle viral

Le cycle de réplication du VIH (Figure 8) est similaire à celui des autres rétrovirus.

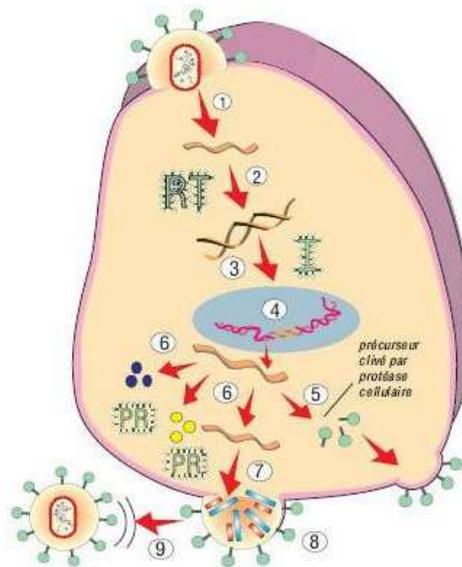


Figure 8 : Cycle de réplication du VIH-1 :

1 - Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane du lymphocyte CD4. 2 - Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN viral par la transcriptase inverse. 3 - Intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire à l'aide de l'intégrase virale. 4/5/6 - Transcription de l'ADN en ARN "messager" puis traduction de l'ARN en protéines. Cela permet de synthétiser de nouveaux virus (synthèse des protéines d'enveloppe, de la capsid et des enzymes virales). 7 - Maturation des virus. 8 - Bourgeonnement du virus. 9 - Libération de nouveaux virus prêts à infecter d'autres cellules (d'après Starcich, BR. et al. Cell, 1996).

Le virus entre en contact avec la protéine CD4 par l'intermédiaire de sa glycoprotéine gp120, ce qui entraîne des modifications de sa forme et lui permet de se fixer sur le corécepteur CCR-5 porté par les macrophages ou le corécepteur CXCR-4 des lymphocytes T. La liaison de la gp120 au CD4 déclenche un changement conformationnel de la glycoprotéine virale conduisant à l'exposition de sites capables de se lier aux corécepteurs (96). La liaison de la gp120 au corécepteur déclenche un changement de conformation de la gp41 et amène un réarrangement de celle-ci entraînant la formation de la superhélice conduisant à l'exposition de la gp41, entraînant ainsi l'activation du processus de fusion membranaire. Les régions N-HR du trimère forment un corps trimérique composé d'hélices α parallèles et positionnées de façon à ce que les peptides fusogènes puissent s'insérer dans la membrane de la cellule cible. Tandis que les régions C-HR des ectodomaines viennent former trois hélices α externes orientées de manière anti-parallèle, autour des parties N-HR. Ce motif structural particulier a été observé dans de nombreux autres virus, dont Ebola. L'insertion du peptide fusogène dans la membrane cellulaire induit la conformation en superhélice ou « *coiled coil* » (Figure 9).

Ce complexe à 6 hélices, ainsi formé, est stabilisé par des ponts disulfures intramoléculaires. Il correspond à la conformation active de la gp41 qui permet l'activité fusogène. Les peptides déstabilisent, enfin, la bicouche lipidique de la membrane cellulaire en formant un pore entre les deux membranes (38, 88). L'inhibiteur de fusion, le T-20, agit à cette étape. Il se lie à la région C-terminale et empêche la formation du complexe à six hélices, rendant la fusion impossible. La conformation prise par la gp41 permet de déstabiliser les deux membranes en *cis* (première couche de phospholipide de l'enveloppe et de la membrane plasmique), entraînant la création d'une structure métastable qui relie les deux membranes entre elles (*stalk*). Par la suite, le lien unissant les deux membranes s'étend et permet la fusion des membranes en *trans* (deuxième couche de phospholipides). Dans les cellules très permissives à l'infection, 50% de la fusion se fait en moins de 30 minutes, alors que dans les cellules les moins susceptibles, cela prend en moyenne 4 heures (131). En tenant compte des notions acquises avec le virus influenza, l'engagement de plusieurs gp120/41 est nécessaire à la déstabilisation des membranes et la formation de pores de fusion. Le processus de fusion du VIH-1 est un mécanisme coopératif où plusieurs éléments entrent en jeu.

Premièrement, la température influence fortement la fusion des membranes. Il a été estimé qu'elle ne pouvait avoir lieu au dessous de 25°C et qu'elle était maximale à 37°C (50, 129). Cette température constitue un élément important lors de la réorganisation des protéines dans la membrane plasmique.

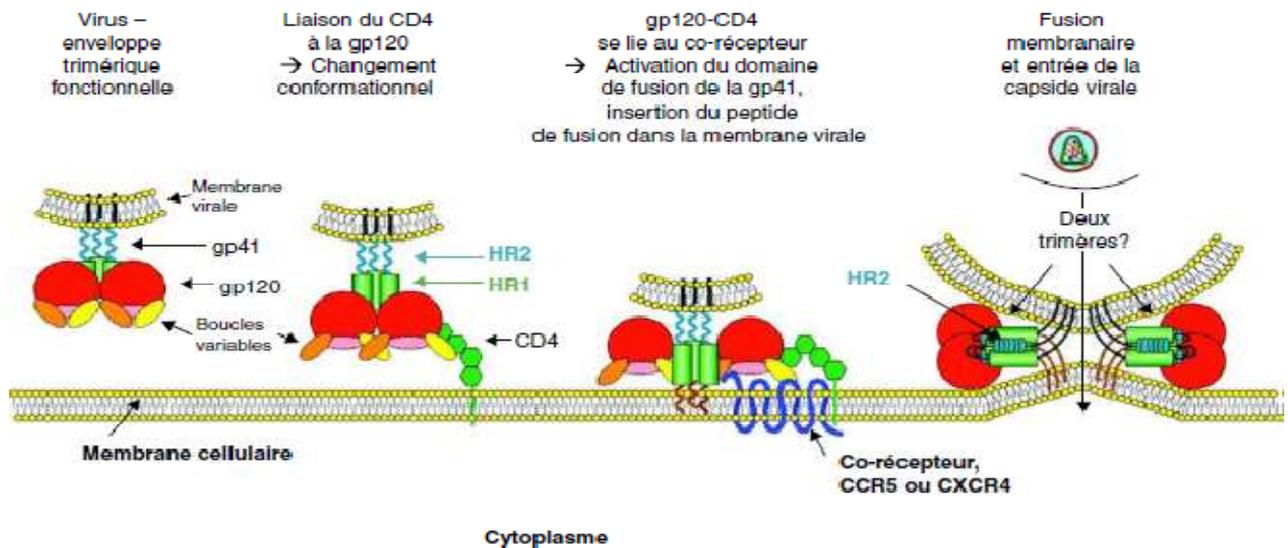


Figure 9 : Cette figure illustre les diverses étapes du processus de fusion du VIH-1. Les différentes étapes de l'entrée du VIH dans les cellules sont décrites. La gp120 en se liant au récepteur CD4 et au co-récepteur subit des changements de conformation qui permettent au peptide de fusion de la gp41 de s'insérer dans la membrane de la cellule cible en formant un état de transition : pre-hairpin. La gp120 se dissocie du complexe et la gp41 subit d'autres transformations qui conduisent au faisceau d'hélices. La formation du faisceau de 6 hélices permet la fusion complète des deux membranes (le nombre de glycoprotéines d'enveloppe nécessaires pour la fusion est sujet à controverses) qui conduit à la libération du génome viral dans le cytoplasme des cellules. (d'après Melikyan, GB. et al. J. Cell. Biol. 2000).

1.4 – La variabilité du virus

L'extrême variabilité des VIH est une des difficultés actuelles pour la recherche d'un vaccin et de thérapies efficaces. Cette variabilité leur permet d'échapper aux stratégies de défenses naturelles ou thérapeutiques. Des souches virales du monde entier sont séquencées et analysées pour comprendre pourquoi et comment le VIH varie.

1.4.1. Les mécanismes engendrant la variabilité

Tous les gènes du VIH-1 sont variables, les gènes gag et pol étant les plus conservés. Le gène *env* est, quant à lui, hypervariable. Cette variabilité génétique, qui se traduit par une diversité antigénique élevée du virus, est liée à plusieurs mécanismes :

- l'absence d'activité correctrice de la transcriptase inverse, induisant la génération d'erreurs à un taux d'environ $3,5 \cdot 10^{-5}$ erreurs par base et par cycle répliatif (82). Ainsi, toute erreur d'incorporation de nucléotides dans la synthèse du brin d'ADN est fixée de manière définitive.
- la recombinaison entre les génomes de deux virus distincts. Les cellules pouvant être infectées par plusieurs virus, les génomes ARN des différents virus peuvent s'associer dans la même particule au moment du bourgeonnement (72). Après infection d'une nouvelle cellule, ils peuvent alors se recombiner au moment de la transcription inverse. Cette propriété explique la possibilité d'apparition de résistances à certains traitements qui seraient moins fréquentes dans le cadre de polythérapies.

La variabilité contribue à la génération de variants viraux intra-individuels, mais également inter-individuels, plus éloignés génétiquement. Ainsi, les souches du VIH-1, isolées à travers le monde, sont continuellement caractérisées en fonction de leur homologie de séquence et peuvent être différenciées en 3 groupes M, O et N.

1.4.2. Les conséquences de la variabilité : le tropisme viral

Le tropisme viral est défini par les espèces et les cellules-cibles

L'aptitude du VIH à infecter différentes populations de cellules est connue sous le nom de «tropisme viral ». Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 jouent un rôle majeur dans la détermination de ce tropisme et, par conséquent, du type cellulaire infecté. Après la découverte du VIH, la tendance de certaines souches à induire la formation de syncytia a été observée et a permis de classifier les souches virales comme étant *syncytium-inducing* (SI) ou *non-syncytium-inducing*

(NSI). Les souches NSI, infectant prioritairement des macrophages et observées lors de la phase précoce et asymptomatique de la maladie, ont été nommées « M-tropiques ». Pour leur part, les isolats viraux SI, plus pathogènes, infectant principalement des lymphocytes T et observés lors des manifestations symptomatiques du SIDA, ont été désignés « T-tropiques » (12).

La découverte des corécepteurs CCR5 et CXCR4 a fourni les bases à l'élaboration d'une nomenclature précisant le tropisme viral. Les souches M-tropiques (ou NSI) utilisent principalement le récepteur CCR5 ont été nommées R5. Les souches virales T-tropiques (ou SI), utilisant préférentiellement CXCR4 ont été nommées X4. Il existe également une troisième population virale désignée R5X4 ou dual-tropic qui utilise indifféremment le CCR5 ou le CXCR4. La diminution sévère de la population lymphocytaire T et l'apparition d'infections opportunistes liées au SIDA ont été observées avec les isolats viraux X4, et R5X4 (Tableau 2).

Tableau 3 : Nomenclature des souches de VIH en fonction de leur tropisme viral

Souche	Cellule cible	Corécepteur utilisé	Pathogénicité
SI, T-tropique, X4	Lymphocyte T	CXCR4	+++
NSI, M-tropique, R5	Macrophage, monocyte	CCR5	+
Dual-tropique, R5X4	Macrophage, monocyte, lymphocyte T	CCR5 ou CXCR4	+++

1.4.3. La conversion phénotypique R5-X4

La transmission précoce du VIH est liée aux souches R5. La plupart des patients (chez environ 50% des individus contaminés) sont infectés d'abord par des virus R5 qui évoluent au cours de l'infection vers des souches X4 hautement pathogènes. Les virus X4 ont tendance à émerger à des stades tardifs de l'infection (la phase de SIDA). Expérimentalement, une souche R5 peut être

convertie en X4, en changeant 2 ou 3 acides aminés (301, 306, 322) au niveau de la boucle V3. Etant donné le rapide renouvellement des virus et le taux d'erreurs au cours de la réplication élevée, cette conversion devrait apparaître rapidement chez un individu infecté. La conversion de R5/X4 est associée à la chute des cellules T CD4+ et la progression vers le SIDA.

Trois hypothèses ont été émises pour décrire la prédominance des virus R5 aux phases initiales de l'infection et les facteurs induisant la conversion phénotypique(108) :

1) La prédominance des virus R5 au début de l'infection est expliquée par une sélection lors de la transmission ou pendant les premiers stades de l'infection (les premières cellules infectées expriment préférentiellement ou exclusivement CCR5 et les muqueuses expriment de forts taux de SDF- 1, chimiokine liant spécifiquement CXCR4, bloquant ainsi ce récepteur). Dans ce cas, la conversion R5-X4 serait due à l'hypothèse de la transmission-mutation de quelques acides aminés sur gp120.

2) Le système immunitaire pourrait supprimer préférentiellement les souches X4. L'affaiblissement du système immunitaire au cours de la progression vers le stade de SIDA favoriserait ainsi l'apparition de virus X4. Une étude (80) a montré qu'un épitope particulier sur la boucle V3 était généralement masqué dans les souches R5, mais constitutivement exposé dans les souches X4. L'existence d'une boucle V3 plus protégée peut donc conférer un avantage sélectif aux isolats R5. Etant donné le rôle crucial de la boucle V3 dans l'infection, de telles souches risquent néanmoins d'être moins infectieuses. Les souches X4, présentant en revanche une boucle V3 plus exposée, risquent d'être plus sensibles au système immunitaire (lorsque celui-ci fonctionne normalement, en début d'infection), mais également plus infectieuses.

3) La conversion phénotypique serait la conséquence d'un changement de la population lymphocytaire au cours du temps. Le taux de prolifération des lymphocytes T naïfs (exprimant CXCR4) augmente, favorisant ainsi la réplication des souches X4.

1.5. La réponse de l'hôte à l'infection virale

La compréhension de la pathogenèse du VIH-1 passe par celle des bases immunologiques du contrôle des infections virales. La réponse de l'organisme face à une invasion virale se divise en deux catégories, innée et acquise. Dans l'immunité innée, il se produit une réponse immédiate et non spécifique, qui est la première ligne de défense de l'organisme. Elle joue un rôle crucial dans le contrôle de l'infection primaire dans les muqueuses. Elle fait intervenir des peptides antimicrobiens, les molécules du complément, les molécules antivirales comme l'INF α/β , les phagocytes (macrophages, neutrophiles), les cellules NK/NKT et les cellules de Langerhans(134). Ces cellules produisent d'importants médiateurs solubles, dont les cytokines, les interférons et les chimiokines, lesquels interfèrent avec la réplication virale et entraînent la mise en place d'une défense anti-VIH spécifique(99).

La réponse immunitaire acquise est dirigée précisément contre un agent microbien. Elle agit par l'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs en cellules effectrices de type TH1 (cellules T CD8+) ou TH2 (cellules B) dans les organes lymphoïdes secondaires à la suite de la reconnaissance d'un antigène spécifique présenté par les CPA (Cellule présentatrice d'antigène). L'activation de ces cellules est cruciale pour la coordination des réponses humorale et cellulaire. La réponse humorale, induite par les infections et la vaccination, fait intervenir les lymphocytes B. Ces cellules, activées par les lymphocytes T CD4+ de type TH2, produisent des anticorps qui se lient aux particules virales (sur des épitopes exposés en surface). Les anticorps participent à la réponse antivirale de trois manières : par leur liaison au virus, 1) ils induisent sa lyse par le complément, 2) ils amorcent sa capture et sa dégradation par les phagocytes et 3) ils inactivent le virus en bloquant son attachement sur les cellules cibles. Bien qu'elle soit cruciale dans la destruction des virus libres, l'immunité humorale est inefficace contre les cellules infectées. Par contre, la réponse médiée par les lymphocytes T CD8+ entraîne la destruction de ces cellules. Tout comme les lymphocytes T CD4+, les CD8+ forment une population hétérogène formée de cellules naïves, de cellules dites mémoire et de cellules effectrices (CTL). Ces dernières, générées à la suite de l'activation des lymphocytes T CD8+ naïfs par les cellules T CD4+ effectrices de type TH1. Elles identifient les cellules infectées ou en détresse et les détruisent. Cette reconnaissance entraîne la

mort de la cellule cible, par l'intermédiaire d'une interaction directe entre la molécule Fas (CD95) et le Fas ligand, et par la dégranulation des CTL libérant au contact de la cible les enzymes toxiques que sont la perforine et les granzymes. Ces cellules produisent également de l'interféron gamma (INF γ), une cytokine inhibant localement la réplication virale, et des facteurs solubles réduisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules (chimiokines Rantes, MIP-1 α et MIP-1 β) (101).

Puisque les lymphocytes T CD4⁺ constituent les pierres angulaires de l'immunité acquise, leur destruction et/ou l'altération de leurs fonctions entraîne inévitablement des dommages dans le contrôle et l'éradication des infections virales, un phénomène observable chez les individus infectés par le VIH-1.

Après stimulation par des peptides viraux, les lymphocytes T helper sont activés et vont induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des anticorps. Ces anticorps peuvent, d'une part éliminer les particules virales libres par des mécanismes d'agglutination, d'opsonisation ou de neutralisation, d'autre part induire la destruction de façon spécifique par les CTLs et les cellules NK des cellules infectées exprimant des épitopes viraux par cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)(47, 151).

Parmi ces anticorps, on distingue les IgA qui sont des immunoglobulines présentes majoritairement dans les sécrétions externes, incluant le lait, la salive, les larmes, et les mucus des tractus bronchiaux, génito-urinaires et digestifs.

D'après des expériences animales conduites par l'équipe de Mario Clerici, l'immunité protectrice au niveau des muqueuses est corrélée avec le nombre de cellules sécrétant des IgA, retrouvées dans les sécrétions cervico-vaginales ou salivaires qui sont capables de neutraliser différents isolats primaires du VIH-1 et d'inhiber la transcytose (26). Ces IgA sont spécifiques d'un épitope qui peut être, par exemple, une séquence conservée de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH (11). Cependant, la prédominance de la réponse immunitaire humorale d'isotype IgG apparaît comme une des caractéristiques majeures de la réponse immunitaire humorale cervico-vaginale au cours de l'infection par le VIH-1.

1.6. Les anticorps neutralisants

Les anticorps neutralisants jouent un rôle essentiel dans la protection contre les infections virales. Ils agissent aux stades précoces de l'infection en empêchant la fixation ou la pénétration du virus. *In fine*, ils empêchent la libération de son matériel génétique à l'intérieur de la cellule-cible. Obtenir une réponse en anticorps neutralisants capables de bloquer des souches VIH différentes constitue un défi majeur.

Plusieurs anticorps capables de bloquer l'infection à VIH-1 ont été décrits. Ces anticorps sont capables de neutraliser les particules virales lors de l'infection empêchant ainsi leur attachement et la fusion avec les cellules-cibles. En effet 5 anticorps monoclonaux humains présentent des capacités neutralisantes vis-à-vis des virus HIV-1 *in vitro* ou *in vivo*. Ces anticorps sont dirigés soit contre la gp120 à savoir le 2G12 et b12 soit contre la gp41 à savoir les anticorps 2F5, 4E10 et Z13. Ces anticorps se sont révélés particulièrement intéressants pour leur capacité à neutraliser un large spectre d'isolats primaires de VIH-1.

1.6.1. Les anticorps anti-gp120 et l'antigénicité de la gp120 :

D'un point de vue antigénique, la gp120 peut être divisée en trois régions définies par leur liaison aux anticorps. La face neutralisante regroupe les régions conservées situées au niveau des sites de liaison du récepteur et des corécepteurs. La face silencieuse est formée par le domaine externe, fortement glycosylé. Elle est virtuellement invisible pour le système immunitaire de l'hôte. La dernière face, non neutralisante, est orientée vers l'intérieur du trimère et n'est donc pas accessible au sein du trimère fonctionnel.

Le PG9 et le PG16 sont deux anticorps qui viennent d'être découverts et sont les premiers anticorps neutralisants à large spectre identifiés chez des patients vivants dans des pays en développement. Ils agissent contre 75% des souches de VIH testées et à de plus faibles concentrations que les autres anticorps neutralisants. Ces deux nouveaux anticorps possèdent une zone de liaison sur le virus qui semble commune ou proche. Pourtant, malgré cette similitude, leurs mécanismes d'action et leurs effets sont vraisemblablement différents. La localisation du site de reconnaissance de ces anticorps sur une région bien particulière de la protéine d'enveloppe

gp120 est intéressante. Elle confirme en effet que ce domaine conserve sa structure d'une souche virale à l'autre, ce qui la rend susceptible d'être repérée par des anticorps neutralisants à large spectre de reconnaissance.(39) Ils ciblent deux régions non variables de la gp120.

La boucle V3 de la gp120, et particulièrement la région comprise entre les résidus 307 et 330 est une région très immunogène capable d'induire des anticorps neutralisants (58, 102). L'immunisation d'animaux avec des peptides mimant la boucle V3 de la gp 120 a en effet permis d'obtenir des anticorps neutralisants : le VIH-1 comme mAbs 447-52D (67, 102)]. Toutefois la boucle V3 de la gp120 est une région très variable d'un isolat à l'autre ce qui entraîne une limitation dans l'utilisation des anticorps anti-V3. Ces derniers ne peuvent en effet neutraliser que les isolats contre lesquels ils ont été produits.

L'anticorps b12 reconnaît un épitope discontinu dans la région gp120. L'IgG1 b12 a été produite en 1994. Le donneur initial de sang ayant conduit à la découverte de cet anticorps était un américain porteur asymptomatique, présumé infecté avec une souche de clade B du VIH-1. Cet épitope chevauche le site d'interaction avec le CD4 (110, 120). L'anticorps b12 neutralise 50% d'un ensemble de 90 isolats primaires testés. La majorité des virus neutralisés est de sous-type B (72%). b12 a été testé pour sa capacité à bloquer la transmission du virus SHIV par voie vaginale chez le macaque Rhésus. Chez 9 macaques sur 12, la transmission du SHIV a été bloquée par cet anticorps (140).

L'anticorps 2G12 est spécifique d'un épitope glycanique de type mannose localisé sur la gp120 au niveau de trois sites de N-glycosylation (119, 123). Cet anticorps neutralise 40% de ce même pool d'isolats primaires de VIH-1. Toutefois, il n'a aucun effet neutralisant sur les isolats de type C ou E. L'activité non neutralisante du 2G12 sur les sous-types C est en accord avec l'absence du site de N-glycosylation en position 295 en N-terminal de la boucle V3. Ce site de N-glycosylation est absent dans plus de 83% des virus de sous-type C. Cependant, la réintroduction de ce site par mutagenèse dirigée restaure la sensibilité à la neutralisation chez 1/3 des virus de sous-type C (59). Ce résultat suggère que des facteurs structuraux sont aussi nécessaires en plus de l'importance de la glycosylation au niveau du site Asparagine 295.

Les anticorps neutralisants anti-gp120 sont essentiellement dirigés contre le site de fixation au CD4 (CD4bs), le site de fixation au corécepteur et les régions hypervariables. D'autres anticorps dirigés contre les corécepteurs sont en développement. C'est le cas notamment de l'anticorps monoclonal PRO140 dirigé contre le CCR5. Cet anticorps inhibe totalement tous les isolats R5 mais n'a aucun effet sur les isolats X4 tropiques (25).

1.6.2. Anticorps anti-gp41 et immunogénicité de la gp41

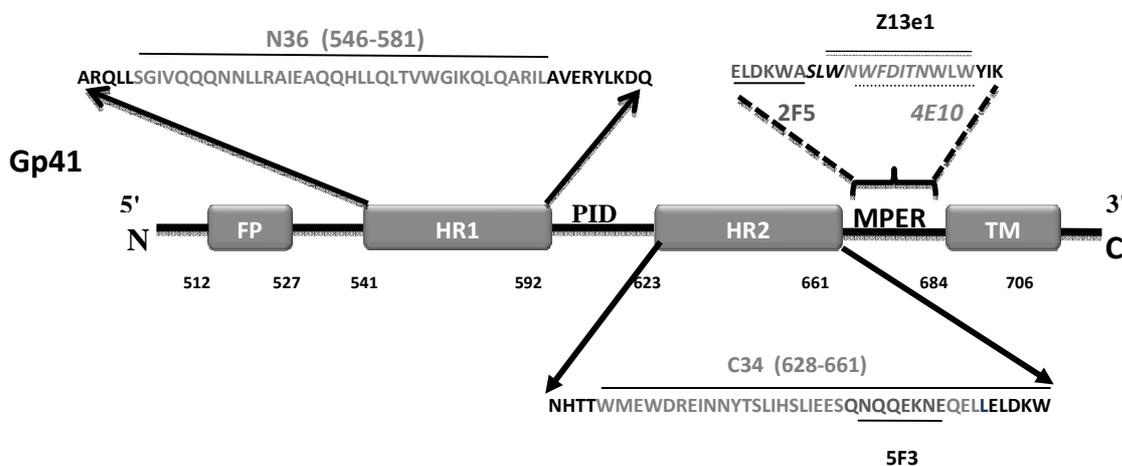


Figure 10 : Représentation schématique de la gp41

Schéma des principales régions de la sous-unité gp41 de la protéine d'enveloppe gp160 du VIH-1 : le N heptad repeat ou HR1 est la partie N-terminale qui lors de la fusion forme un complexe avec le C heptad repeat ou HR2 pour former un intermédiaire de fusion. FP : peptide de fusion qui entre en contact le premier avec la membrane de la cellule-cible. C'est la partie qui est insérée dans la membrane virale.

Bien que la gp41 soit le plus souvent masquée par la gp120 sur la particule virale, cette association gp120/gp41 peut être exposée transitoirement au système immunitaire. En outre, la gp41 peut l'être durant l'infection dans différentes structures transitoires pendant les étapes du processus de fusion. La réponse humorale naturelle décrite chez les patients VIH-1 comporte

généralement une forte activité contre la gp41. Plusieurs régions de la gp41 sont fortement immunogènes comme les régions NHR, la boucle d'identification, la région MPER, et le complexe de fusion. Les réponses humorales contre la gp41 sont majoritairement sériques de type IgG mais la production d'anticorps muqueux notamment dans la salive de patients infectés a été décrite par notre équipe ainsi que par d'autres (141).

1.6.2.1 La région FP (peptide de fusion)

Cette région correspond aux 15 premiers acides aminés de la gp41 (acides aminés 512-527). Cette région de la gp41 est enfouie dans le complexe quaternaire gp120/gp41 dans le virus natif et est exposée seulement après la liaison de la gp120 au récepteur CD4. (13, 87).

La participation de la FP dans la fusion membranaire virale et cellulaire a été confirmée par des études de mutation (14, 48, 124). Le peptide de fusion s'insère dans la membrane de la cellule de manière oblique et cette insertion serait à l'origine de la déstabilisation de la membrane avant la fusion avec la membrane virale(14).

1.6.2.2 Immunogénicité de la région N- terminale heptad repeat (N-HR) ou HR1 .

L'immunoréactivité de cette région a été largement décrite chez les patients VIH-1(104) . Plusieurs anticorps monoclonaux ont été produits et caractérisés contre la région NHR et notamment contre l'épitope AGSTMGAASMTLTVQARQ (aa 525 à 543), cette région est contiguë (avec une portion chevauchante) au peptide de fusion (16). L'anticorps monoclonal D5 dirigé contre le trimère de la région NHR a été généré à partir d'une bibliothèque de fragment scFv (single chain fraction) et, comme le peptide T-20, inhibe la fusion *in vitro* (91) . De nouveaux anticorps monoclonaux ayant une activité neutralisante limitée contre le trimère NHR du VIH-1 ont été isolés par criblage d'une librairie de phages (92). Ces études indiquent le potentiel antigénique de cette région comme cible pour la conception de vaccins.

1.6.2.3 Immunogénicité de la boucle immunodominante ID.

La boucle ID (aussi connue sous le nom de cluster épitope I) a été identifiée comme la région immunodominante de la gp41. Cette région est très immunogène et de nombreux anticorps sont dirigés contre elle. Bien que la plupart des anticorps contre cette région ne sont pas neutralisants, un anticorps monoclonal spécifique a été décrit comme étant neutralisant contre des souches de laboratoire de clade B et contre trois isolats primaires du groupe O (46). Cependant, certains anticorps monoclonaux produits contre cette région semblent accroître la capacité d'infection de certains virus VIH-1 (111) .

1.6.2.4 Immunogénicité de la région C-terminale heptad repeat (C-HR)ou HR2.

Certains épitopes de la région CHR (aa 628 à 661) sont exposés seulement après l'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4. Cette région semble masquée lors de son interaction avec la gp120. Toutefois, une région relativement située près de l'extrémité N-terminale de l'épitope 2F5 (ELDKWA), a été décrite comme immunogène et nommée cluster épitope II (aa 644 à 663) (150)

1.6.2.5 Immunogénicité du complexe de fusion NHR-CHR.

La fusion membranaire du virus avec la cellule-hôte nécessite une interaction entre les deux régions NHR et CHR pour former le complexe de fusion. Ce complexe est une structure stable. Il a été démontré que la formation du complexe de fusion (6HB) permet l'agrégation de plusieurs complexes d'enveloppe activés formant ainsi un pore par lequel la nucléocapside pénètre dans la cellule (128). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que des peptides synthétiques représentant le complexe 6HB à très faibles concentrations, peuvent inhiber l'infection et la fusion membranaire *in vitro* (61, 141, 149).

La fusion est considérée comme un processus très dynamique au cours duquel différentes conformations de la gp41 peuvent coexister.

Pour surmonter les difficultés à produire de la gp41 et notamment le complexe de fusion dans sa forme native, plusieurs études ont utilisé des peptides synthétiques afin de générer des anticorps monoclonaux spécifiques. D'autres approches ont été basées sur l'utilisation de bibliothèques aléatoires d'anticorps humains naturels. Cette dernière approche a permis de caractériser deux anticorps de type Fab (8066 et 8062) dirigés contre le trimère N-HR et plus largement contre le complexe de fusion (61). L'anticorps Fab 8066 est neutralisant contre un large panel de virus VIH-1 de clade B et C, tandis que l'anticorps Fab 8062 est non neutralisant (61).

Les anticorps m44, m46 et m48 ont été identifiés à partir d'une banque d'anticorps provenant des cellules de la moelle osseuse de trois patients non progressifs ayant des titres sériques élevés en anticorps neutralisants. L'activité neutralisante de m46 contre un panel d'isolats primaires de clade C était significativement élevée (IC₅₀=25pg/ml). m44 reconnaît le complexe de fusion mais pas la région N-HR. L'anticorps m44 ne se lie pas à la protéine gp140 ni à des peptides linéaires représentant la gp41, ce qui suggère que cet anticorps contient un épitope conformationnel (155).

1.6.2.6 Immunogénicité de la région MPER.

L'immunoréactivité de cette région a été largement décrite chez des patients VIH-1 (65). Elle est de l'ordre de 30% chez les patients VIH-1 mais décroît avec la progression de la maladie (18). Ces données font de cette région une cible de choix pour la vaccination et la génération d'anticorps monoclonaux. Cette région est fortement conservée. Contrairement aux régions NHR et à la boucle IDF, la région MPER est faiblement immunogène. Cependant trois anticorps monoclonaux importants (2F5, 4E10 et Z13) ont été produits et caractérisés contre cette région (16, 95, 157). Les anticorps 2F5 et 4E10 possèdent une activité neutralisante modérée contre de nombreuses souches de laboratoire et d'isolats primaires. Initialement caractérisés comme des IgG3, ces anticorps sont des IgG1 (86). Des études ont indiqué que le 2F5 et le 4E10 se lient faiblement à la cellule infectée et donc ils n'ont pas d'activité ADCC (122, 157)

L'anticorps monoclonal 2F5 reconnaît un épitope localisé dans l'ectodomaine de la gp41. Il reconnaît un épitope qui s'étend de l'Acide Glutamique 662 à l'Alanine 667(ELDKWA).

L'anticorps 2F5 a été isolé à partir de cellules B immortalisées lors d'un criblage d'anticorps anti-VIH-1. Il neutralise 67% des isolats testés mais reste sans effet sur les virus de sous-type C. Les études immunochimiques montrent que le 2F5 réagit fortement avec le peptide C43 représentant une partie de la région du C-heptad de la gp41, bien qu'il n'ait aucune réactivité avec le peptide N51, représentant la région du N-heptad de la gp41. Alors que le 2F5 réagit avec le N51/C43 qui forme un complexe en pelote enroulée (coiled coil), il réagit moins fortement sur le C43 seul (33, 57). Alors que ceci pourrait suggérer que le 2F5 interfère avec la formation de la gp41 en pelote enroulée, ce n'a pas été confirmé par des études récentes. Ainsi, le mécanisme de neutralisation par le 2F5 est encore inconnu, bien que l'interférence avec le processus de fusion ait été suggérée (33).

Des études (138) ont montré que l'épitope du 2F5 présente une conformation en boucle β et que des antigènes présentés dans un contexte similaire pourraient mieux mimer l'épitope du 2F5 et par conséquent améliorer la liaison de cet anticorps.

Le 2F5 est l'un des anticorps les plus étudiés dans le cadre de l'élaboration de nouveaux vaccins anti-VIH-1. Plusieurs difficultés existent pour obtenir des immunogènes stables, flexibles et qui peuvent mimer le plus fidèlement possible les contextes naturels de conformation native de présentation des épitopes durant les étapes de rapprochement et de fusion des virus.

L'anticorps 4E10 a été isolé à partir de lymphocytes B de patients séropositifs. Il est très protecteur contre l'infection par des isolats primaires ainsi que par des souches de laboratoire de VIH-1. Le 4E10 se lie à un épitope linéaire très conservé dont la séquence $^{671}\text{NWF(D/N)IT}^{676}$ a été décrite (157).

Grâce à la substitution par des résidus Alanine, les acides aminés W^{672} , F^{673} , I^{676} se sont avérés être essentiels pour la liaison du 4E10, étant donné que leur remplacement fait baisser la liaison d'environ 100 fois (15).

L'étude de la longueur optimale pour une reconnaissance la plus étroite possible a montré que la séquence $^{671}\text{NWF DITNWLWYIK}^{683}$ est optimale pour l'anticorps 4E10.

Des études montrent que certaines souches du VIH-1 ne sont pas neutralisées alors qu'elles présentent le motif NWF(N/D)IT ce qui peut être expliqué par le fait que l'épitope reconnu par l'anticorps 4E10 est plus complexe et serait même discontinu. Par spectrophotométrie de masse, l'anticorps 4E10 se lie à la région N-terminale de la gp120 et à la gp41 dans la conformation native. L'affinité du 4E10 pour différentes séquences a été démontrée (LLELDKWASLWNWFDITNWL de la gp41 ou LWVTVYYGPVWK de la gp120) dans cette étude. Il a été suggéré que le motif NWFN/DTT forme un épitope cryptique qui n'est accessible que pendant les étapes intermédiaires de la fusion (133)

Hormis le fait que l'anticorps 4E10 présente une polyspécificité pour des auto-antigènes du lupus érythémateux disséminé ou des histones, cet anticorps est considéré comme l'un des plus réactifs contre le VIH-1 et le plus neutralisant.

Le mécanisme par lequel 4E10 interagit avec le domaine particulier de la glycoprotéine gp41, le MPER qui est immergé dans la membrane virale ce qui rend son épitope difficilement accessible aux anticorps, a été démontré. Il possède une protubérance en son centre. Le 4E10, anticorps neutralisant de large spectre, se fixe sur la protubérance et, ce faisant, extrait les zones clés du MPER qui restaient inaccessibles à l'intérieur de la membrane. Le 4E10 se fixe alors sur ces régions nouvellement exposées, formant ainsi un ancrage plus solide pour le virus et diminue la capacité de la gp41 à fusionner avec la membrane cellulaire (136).

Plusieurs études pharmacocinétiques et essais cliniques de phases de I et II où le 4E10 est administré avec le 2F5 et le 2G12 montrent que ces trois anticorps arrivent à maintenir la charge virale indétectable chez les patients où l'infection a été contrôlée par un traitement antiviral. Ces études montrent également que le 4E10 n'induit ni allergie ni réponse immunitaire et il entraîne rarement la production d'IgM anti-4E10 et aucune apparition d'IgG anti-4E10 n'a pas été observée. De plus, la clairance et la demi-vie du 4E10 sont identiques à celles d'anticorps utilisés pour le traitement de différentes pathologies (70).

L'anticorps FabZ13 est un anticorps qui est situé du côté C-terminal de la gp41 comme le 2F5 dont la séquence chevauche celle du 4E10 dans la région de l'ectodomaine proche de la

membrane. Les anticorps monoclonaux 4E10 et Z13 neutralisent efficacement des isolats primaires de clades diverses (A, B, C, D et E) (157).

L'anticorps monoclonal clone 3 se lie à un épitope linéaire situé entre les résidus 597 et 606 de la partie C-terminale de la région la plus immunodominante qui est située en (597- 613) de la gp41 (31). Cet épitope est relativement bien conservé si bien que cet anticorps possède une capacité importante à neutraliser des souches de laboratoire et différents isolats primaires du groupe O (31, 46).

1.6.2.7 Immunogénicité de la région C-terminale et intracytoplasmique.

Cette région C-terminale est majoritairement incorporée dans la membrane virale. Cependant certains épitopes sont accessibles à la surface de la particule. En particulier, plusieurs anticorps monoclonaux ont été décrits contre une région hydrophile comportant l'épitope de Kennedy, très immunogène (PRGPDRPEGIEEEGERDRDRS) à l'extrémité N-terminale de la région CT (aa 724 à 745) (27)

Tableau 4: Anticorps monoclonaux décrits contre la gp41. TCLA (T cell line adapted) : virus adapté sur lignée cellulaire, IP : isolates primaire

Nom	Type	Activité	IC50/IC80 décrite	Références
Cluster I (aa 596-613)				
1B8	mAb	Non neutralisant		(5)
86	mAb	Non neutralisant		(135)
50-69, 181-D,240-D, 1367	mAb	Non neutralisants		(56)
V10-9	mAb	Non neutralisant		(112)
3D6	mAb	Non neutralisant		(44)
2F11	mAb	Non neutralisant		(40)
1F11, 1H5, 3D9, 4B3, 4D4, 4G2	mAb	Non neutralisants		(16)
clone 3	mAb	TCLA*, IP**		(31)
F240	mAb	Non-neutralisant		(20)
A1, A4, M8B, M12B, M26B, T2	Fab	Non-neutralisants		(8)
Cluster II (aa 644-663)				
98-6, 126-6, 167, 1281, 1342, 1379	mAb	Non-neutralisants		(56)
ND-15GI	mAb	Non-neutralisant		(42)
Md-1	mAb	Non-neutralisant		(24)
D5, D11, G1, M10, M12, M15, S6, S8, S9, S10, T3	Fab	Non-neutralisants		(8)
m44	Fab	IP		(154)
m46	Fab	IP		(154)
m48	Fab	IP		(154)
Adjacent to Cluster II				
2F5	mAb	IP	IC50=0.68µg/ml TZM-bl	(95)
4E10	mAb	IP	IC50=0.17µg/ml TZM-bl	(157)
Z13	Fab	IP	IC50 > 40µg/ml TZM-bl	(97)
Cluster III(aa 619-648).				
A9, G5, G15, L1, L2, L11	Fab	Non-neutralisants		(8)

A ce jour, 28 anticorps monoclonaux humains et 27 fragments Fab dirigés contre la gp41 ont été décrits. Parmi eux, 24 anticorps monoclonaux et Fab sont dirigés contre la région immunodominante du groupe I (aa 579-604) alors que 23 anticorps monoclonaux et des fragments Fab sont spécifiques du groupe II (aa 644-663), 3 sont spécifiques d'un épitope situé à proximité du cluster II, et 6 fragments Fab sont spécifiques du groupe III. Seuls 7/55 anticorps monoclonaux dirigés contre la gp41 sont neutralisants contre des souches de laboratoire et des isolats primaires avec une efficacité variable (2F5, 4E10, clone 3, Z13, m44, m46 et m48).

Les anticorps monoclonaux 98-6, 126-6, 167-D, 1281 et 1379 ont été produits en immortalisant des cellules B circulantes provenant de patients VIH-1 séropositifs. Ces anticorps montrent une forte affinité pour la structure « post-fusion » et se lient faiblement à la structure « pré-fusion ». Il a été supposé que ces anticorps ciblent une structure tardive dans le processus de l'entrée du virus lors de la fusion complète (49).

Un fragment scfv anti-gp41 produit chez le lapin (8K8) et un fragment Fab humain anti-gp41 (DN9) ont également été isolés. Leurs épitopes chevauchent partiellement l'épitope reconnu par l'anticorps D5. L'affinité de ces deux anticorps avec la région N-HR trimérique semble supérieure à celle du D5. La molécule entière 8K8-IgG possède une activité neutralisante très modérée contre des isolats primaires de clade B et C dans un modèle de pseudo-virus (98).

1.7. Les traitements

Les enzymes virales utilisées au cours du cycle de réplication du VIH constituent des cibles de choix pour mise au point de molécules inhibitrices.

Seront discutés uniquement les traitements bloquant l'entrée du VIH dans la cellule.

1.7.1. Les inhibiteurs d'entrée du virus

Le processus d'entrée du VIH étant une étape clef dans le cycle de réplication virale, de nombreux travaux ont été effectués afin de trouver un moyen de le bloquer. Cette étape fait intervenir différentes molécules, aussi bien présentes à la surface du virus (gp120, gp41) que de la cellule cible (CD4, corécepteurs). Ces dernières représentent donc autant de cibles potentielles pour la conception d'inhibiteurs. Différents types d'inhibiteurs ont été étudiés et mis au point avec plus ou moins de succès. On peut distinguer des inhibiteurs de type immunologiques comme des anticorps dirigés contre les différentes protéines entrant en jeu dans la fusion(cette étape fait l'objet de cette thèse) , des inhibiteurs de type peptidiques agissant la plupart de temps par effet antagoniste avec les domaines peptidiques qu'ils miment et enfin des inhibiteurs chimiques.

1.7.2. Inhibiteurs peptidiques

1.7.2.1. Peptides dérivés du CD4

Des peptides mimant certaines régions de CD4 ont été également mis au point. Il s'agit notamment du CD4M9 obtenu en remplaçant une boucle de la charybdotoxine du scorpion par un analogue de la boucle du domaine CDR2 du CD4 qui se lie à la gp120. Ce peptide va agir par antagonisme avec le CD4 en se fixant sur la gp120 (142). Ce peptide a été optimisé pour obtenir un fragment de 27 acides aminés appelé CD4M33 agissant à des concentrations de l'ordre du μM et efficace sur les isolats primaires (83). Afin de bloquer plus efficacement les trimères de gp120, des molécules bivalentes, contenant deux fragments M9 liés entre eux par un linker ont été développées, augmentant ainsi l'activité de ces peptides de 5 à 20 fois (77).

1.7.2.2. Peptides dérivés des chimiokines

La modification des ligands naturels des co-récepteurs, les chimiokines, est une piste privilégiée dans la recherche d'inhibiteurs anti-VIH. Les chimiokines peuvent bloquer l'infection du VIH par différents mécanismes, principalement par gêne stérique et/ou en provoquant l'endocytose de leur récepteur associé (1, 10, 28). *In vitro*, un certain nombre de chimiokines modifiées (AOPRANTES, NNY-RANTES, RANTES 9-68, RANTES 3-68, Met-RANTES) sont développées contre CCR5. Cependant, des problèmes de pharmacocinétique, d'interférence avec la physiologie, d'émergence de résistance virale et de coût de production rendent leur développement clinique très incertain.

1.7.2.3. Peptides dérivés de la gp41

Des peptides synthétiques dérivés du domaine HR2 ont prouvé leur capacité à inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* et *in vivo* (21, 22, 68, 69, 147, 148).

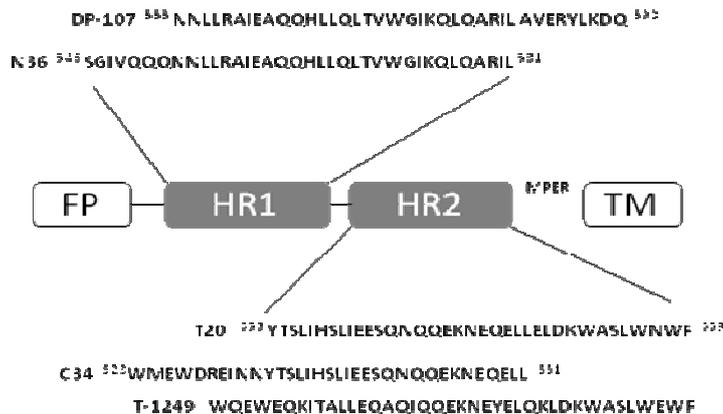


Figure 11 : Présentation des séquences d'acides aminés de différents inhibiteurs agissant au niveau de la gp41.

(D'après Weissenhorn W. et al. Nature 1997)

Les peptides synthétiques DP107 et DP178 miment la région HR2 de la gp41 et se lient de manière compétitive aux régions hydrophobes du trimère HR1, empêchant la formation du complexe 6HB entre HRI et HR2. DP107 est un peptide de 39 acides aminés dérivé de l'extrémité NH2 de la région HR2 de la gp41 (acides aminés 558 - 595 de la gp41 du VIH-1LAI)

[57, 58]. DP107 a ensuite été nommé T21. DP178 est un peptide de 36 amino-acides dérivé de l'extrémité carboxy-terminale de la région HR2 (acides aminés 127-162 de gp41 du VIH-1LAI) riche en tryptophane. Cet inhibiteur a été nommé plus tard T20 (Enfuvirtide, Fuzeon ou Pentafuside). Un peptide synthétique de deuxième génération issu de l'extrémité carboxy-terminale est le T1249 [60].

Une résistance a été observée au cours de traitement par Enfuvirtide [78], indiquant qu'il ne devrait pas être administré en monothérapie [79]. La mutation se produit dans un motif de 10 acides aminés qui est situé entre les résidus 36 et 45 de la gp41 [78, 80-82]. Cette région fait partie du site de liaison de l'Enfuvirtide qui est essentiel pour la fusion virale.

Il était admis que le T20, comme les peptides C (SJ-2176, C34) bloquent la formation du complexe 6HB entre HR1 et HR2. Des études récentes ont montré que la partie C-terminale de T20 interagit avec la membrane ou avec une région de la gp41 proche de la membrane empêchant ainsi le recrutement à ce niveau-là d'autres complexes gp41-membrane nécessaires à la formation du pore de fusion (153). D'autres études ont montré que le T20 pouvait interagir également avec le domaine de la gp120 qui se fixe normalement au corécepteur CXCR4 (152).

Le peptide C34 est un peptide dérivé de la région HR2 correspondant aux résidus 628-661 de la gp41. Il contient les 3 acides aminés, le tryptophane 628, le tryptophane 631 et l'isoleucine 635, qui sont essentiels pour l'interaction avec le domaine HR1 et leur présence explique l'activité inhibitrice de ce peptide qui est supérieur d'un facteur 10 au T20 avec une IC₅₀ de l'ordre du nM. Ce peptide va agir comme antagoniste du domaine HR2 naturel du VIH en se fixant sur le domaine HR1 de la gp41, bloquant ainsi la formation du complexe 6HB avec le HR2 natif et donc le processus de fusion. La présence des résidus tryptophane 628, 631 et isoleucine 635 en se fixant dans la cavité hydrophobe spécifique du N36 assurent une grande stabilité au complexe N-C (21). Cette cavité étant très conservée dans les différents isolats de VIH, le peptide C34 est neutralisant sur un large spectre de virus.

Le peptide T-649 est un analogue du peptide C34 avec deux acides aminés supplémentaires (2 thréonines) en C-terminal. Il interagit avec HR1 au niveau de la poche hydrophobe et bloque ainsi la formation de complexes comme le C34. L'utilisation d'analogues du peptide C34 se trouve limitée par leur faible solubilité par rapport au T20. Ce peptide s'est avéré plus efficace que le T20

sur un panel de 55 isolats primaires de VIH-1 (36). L'apparition de virus résistants en utilisant ce peptide est beaucoup plus tardif qu'avec le T20 (2). Les propriétés antivirales plus efficaces du T-649 proviennent de sa capacité d'établir des liaisons plus stables avec la poche hydrophobe de HR1 (21).

Le T1249 est un peptide de 39 acides aminés. Similaire à un domaine de la protéine gp41 qui comprend à la fois la partie C terminale du C34 contenant le domaine de fixation à la poche hydrophobe de HR1 et la partie N-terminale du T-20 qui contient la séquence ELDKWA. Il est actuellement en phase d'expérimentation clinique. Il possède un plus large spectre d'inhibition (HIV-1, HIV-2, SIV) que les peptides T20 et T-649 (89, 107). Cependant, l'utilisation de ces peptides chez l'homme reste difficile à cause des limitations liées à leur biodisponibilité. De plus, le traitement par le T20 est très coûteux, estimé à 2700 €/mois. Le développement d'autres inhibiteurs est en cours, bloquant notamment la fonction des récepteurs CCR5 et CXCR4.

Tableau 4 : Présentation des différentes molécules actuellement en développement.
D'après (Reeves and Derdeyn 2007).

Peptides inhibiteurs	Cible principale
T-20/Enfuvirtide(DP-178)	HR1
T-649(C34)	HR1
T-1249	HR1
T-21(DP-107)	HR2, HR1
N36	HR2, HR1

1.8. Les vaccins

Le développement d'un vaccin s'inscrit comme une priorité dans la lutte contre la propagation de la pandémie. La mise au point d'un vaccin contre le sida se heurte cependant à des obstacles considérables.

Tableau 5 : Obstacles au développement d'un vaccin contre le VIH

- *Hyper-variabilité et diversité antigéniques du virus
- *Transmission par voie muqueuse
- *Intégration du génome viral dans l'ADN de la cellule-hôte
- *Transmission du virus par les cellules infectées
- *Dysfonctionnement et destruction du système immunitaire de l'hôte
- *Absence d'élimination du virus et des cellules infectées malgré une forte réponse immune de l'hôte
- *Emergence rapide de mutants d'échappement aux anticorps et aux lymphocytes T cytotoxiques(CTL)
- *Possibilité de surinfections ; création de recombinants

Tout le monde s'accorde à penser qu'un vaccin idéal devrait induire à la fois des anticorps neutralisants, des réponses T CD8+ et une défense immunitaire au niveau des muqueuses.

1.8.1. Les vaccins inducteurs de l'immunité cellulaire

Des vaccins vivants recombinants, à base de vecteurs divers, capables d'induire des réponses T contre un ou plusieurs antigènes du VIH, notamment Gag, Pol, Env et Nef, mais aussi éventuellement Tat, Rev ou Vpu sont en cours d'étude. Le but de ces vaccins est de permettre au sujet qui s'infecte de limiter par le biais de ses réponses T CD8+ la multiplication du virus dans l'organisme et d'empêcher ou au moins de ralentir la destruction de ses lymphocytes T CD4+. En d'autres termes, il s'agit de faire de chaque sujet infecté un «contrôleur» susceptible de rester en bonne santé pendant de longues années et de n'être que peu ou pas contagieux pour ses

partenaires. Les principaux vecteurs utilisés pour ces vaccins sont des vecteurs viraux de virulence atténuée ou non répliquatifs, notamment des poxvirus et des adénovirus. Ces derniers paraissent aujourd'hui les plus performants chez l'homme. Un des problèmes que soulève l'emploi des vaccins vectorisés est l'immunité anti-vecteur qui s'établit dès la première injection du vaccin, voire qui préexiste dans la population, comme c'est le cas pour l'Ad5. Cette immunité limite l'immunogénicité du vaccin.

L'étude STEP était un projet conjoint de Merck & Co. Inc., du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) et du réseau HVTN (HIV Vaccine Trials Network). L'essai portait sur le candidat vaccin contre le VIH-1 MRK-Ad5 de Merck. Le candidat vaccin contenait trois gènes du VIH (gag, pol, nef), qui sont le plus souvent ciblés par les lymphocytes T chez les sujets séropositifs, et visait les réponses immunitaires à médiation cellulaire que l'on estime importantes pour contrôler l'infection à VIH aux premiers stades de la contamination. Le vaccin utilisait une version affaiblie d'un virus commun (Adénovirus type 5 – Ad5) comme vecteur pour les gènes. Trois mille participants à risque élevé d'infection à VIH ont été intégrés dans l'essai. Les participants se composaient de 62 % d'hommes d'âge moyen de 29 ans. Les essais ont été interrompus en 2007 car ce vaccin ne prévenait pas l'infection à VIH et ne semblait pas réduire la réplication du virus chez les vaccinés infectés. L'analyse provisoire a révélé que chez 741 volontaires ayant reçu au moins une dose de vaccin, 24 cas d'infection à VIH sont apparus, comparativement à 21 cas d'infection chez 762 participants du groupe placebo. En outre, dans le sous-groupe qui avait reçu deux doses de vaccin, 19 cas d'infection à VIH ont été observés chez 672 volontaires ayant reçu le vaccin, et 11 cas ont été observés chez les 691 volontaires qui ont reçu le placebo. Chez ceux qui ont été infectés, les taux d'ARN du VIH étaient semblables chez les sujets vaccinés et ceux du groupe placebo (40 000 copies/mL pour les vaccinés et 37 000 copies/mL pour les sujets du groupe placebo), ce qui n'indiquait aucune différence significative de la charge virale chez les sujets vaccinés et ceux du groupe placebo. Cependant, chez ceux qui avaient des niveaux élevés d'immunité contre l'adénovirus, la différence était statistiquement significative, ce qui suggère que le vaccin peut avoir provoqué une activation de la réponse immunitaire qui a rendu les sujets plus vulnérables au VIH en stimulant les cellules réceptrices ou en éliminant les défenses immunitaires contre le VIH. L'immunité élevée contre l'Ad5 entraînait un risque d'infection trois fois plus élevé chez les sujets vaccinés que chez ceux du groupe

placebo, et aucun risque accru chez les sujets ayant une faible immunité contre l'Ad5 comparés au groupe placebo. (17)

Le vaccin prophylactique VAC 18 a été débuté en septembre 2004, il s'est agi du premier essai de phase II réalisé en France et en Europe. Le vaccin ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA) repose sur l'utilisation des lipopeptides. Les lipopeptides sont constitués de fragments de cinq peptides longs du VIH (Gag 17-35, 253-284, Pol 325-355, Nef 66-97 et 116-145), contenant plusieurs épitopes reconnus par les cellules CD8+ et CD4+ et des lipides (palmytoil). La partie lipidique a été ajoutée pour favoriser la pénétration des peptides dans les cellules immunitaires. L'objectif était de comparer l'immunogénicité et la tolérance de trois doses du vaccin LIPO-5 (500, 150 ou 50 µg) chez des sujets volontaires. Ce vaccin a induit des réponses cellulaires. La majorité a stimulé des lymphocytes CD4+ (75%) et CD8+ (60%) dirigés contre Gag 253-284. La réponse CD8+ contre Nef et Pol a été observée dans 36% et 33%. Le candidat vaccin LIPO-5 sera utilisé dans des stratégies de « prime-boost » dans des futurs essais.(116)

Les résultats de l'essai RV144 (Etude Thai) publiés récemment ont pour la première fois démontré l'efficacité potentielle d'un vaccin prophylactique sur une large cohorte de 16402 sujets volontaires âgés entre 18 et 30 ans et séronégatifs le jour du démarrage de l'essai. Il a été conçu pour tester l'efficacité d'une solution vaccinale contre l'infection par le VIH et contre la progression vers le SIDA en cas d'infection. Le vaccin utilisé lors de l'essai RV144 est une combinaison de deux vaccins différents. L'Alvac-HIV est le premier vaccin qui exprime les antigènes gag/protéase de clade B (souche LAI) du VIH ainsi que l'enveloppe gp120 d'un virus de clade E associée à la partie transmembranaire de la gp41 de la souche LAI. Le deuxième vaccin est l'Aidsvax B/E qui est une solution des deux protéines de gp120 solubles de clade B (isolat MN) et de clade E (isolat CM244). Les sujets vaccinés ont reçu quatre injections d'Alvac-HIV aux semaines 0, 4, 12, et 24 ainsi que deux injections d'Aidsvax en rappel aux semaines 12 et 24. Les résultats présentés comportent trois analyses différentes. La première analyse concerne l'ensemble des sujets intégrés dans l'essai et qui ont reçu au moins une injection : c'est le groupe « Intention de traiter » (ITT). De ce groupe ont été exclues 7 sujets (5 vaccinés, 2 placebo) car elles ont présenté une séroconversion dans les jours suivant le début de l'essai. Des tests réalisés sur leurs échantillons prélevés au moment de l'enrôlement ont montré qu'elles étaient déjà infectées avant

le début de l'essai clinique. L'ensemble des sujets volontaires à l'exclusion de ces 7 patients correspond au groupe « Intention de traiter modifiée » (mITT). Enfin, 3853 patients ont été exclus de l'analyse « Per Protocole » (PP) car ils n'ont pas reçu l'ensemble des 6 injections, ou bien à des dates différentes de celles fournies dans le protocole. De plus, les patients ayant été déclarés séropositifs avant la dernière injection de vaccin ont également été exclus de l'analyse PP. Les analyses de l'étude rapportent 26,2% d'efficacité de protection dans le groupe PP, 31,2% dans le groupe mITT et 26,4% sur l'ensemble du groupe ITT. Seuls les résultats obtenus lors de l'analyse mITT sont statistiquement significatifs ($p=0,039$). Pour l'instant, les tests réalisés sur les lymphocytes circulants prélevés à différents temps après vaccination ont été réalisés sur un petit échantillon de patients (160 vaccinés et 40 sujets placebo). Ils ont porté d'une part sur les réponses cellulaires (Elispot, marquage intracellulaire de cytokines, et prolifération des lymphocytes dirigés contre le VIH) et d'autre part sur les réponses humorales par la production d'anticorps contre les gp120B/E et la protéine p24 de la capsid. Ce qui est manifeste d'après les résultats préliminaires, c'est la faiblesse de l'immunogénicité globale du vaccin. Des différences significatives sont observées au niveau de la réponse IFN-gamma spécifique des lymphocytes CD4 dirigés contre l'enveloppe (positive chez 32% des vaccinés contre 2% des sujets placebo) et de la lymphoprolifération après stimulation par les antigènes gp120 et p24. Les tests Elispot mettent aussi en évidence une réponse anti-env plus élevée chez les vaccinés. Au contraire, les sujets vaccinés ne développent pas ou peu de réponse cellulaire anti-gag et cette réponse ne semble pas associée à la protection observée. Par ailleurs, tous les sujets vaccinés (99%) ont produit des anticorps anti-env et plus de la moitié des anticorps anti-gag, mais ceux-ci s'avèrent être des anticorps peu actifs, bien différents de ceux qu'on appelle anticorps neutralisants à large spectre et qui sont très efficaces pour bloquer le VIH dans les expériences in vitro. (109)

1.8.1.1. Vaccin ADN

Il existe un autre grand type de vaccins susceptibles d'induire des réponses d'immunité cellulaire, ce sont les vaccins ADN, constitués de plasmides bactériens dans lesquels on a inséré les gènes viraux choisis avec les signaux d'expression nécessaires et que l'on injecte à l'état d'ADN purifié.

Ces vaccins présentent de nombreux avantages, comme la facilité de leur préparation, leur faible coût, leur stabilité, qui permet de se passer de la chaîne du froid, et leur efficacité en primo-vaccination dans des protocoles de type «prime-boost», suivi de rappels de vaccins vivants recombinants. L'engouement suscité par les très bons résultats initiaux des vaccins ADN chez la souris s'est considérablement atténué par la suite au vu de leur immunogénicité médiocre chez les primates non humains et chez l'homme. Plusieurs tentatives d'amélioration ont été entreprises (humanisation des codons, addition de motifs adjuvants CpG; co-expression de diverses cytokines) mais leur succès reste limité. Une observation récente effectuée dans le laboratoire Wyeth vient relancer le débat en montrant qu'on peut augmenter considérablement l'immunogénicité de ces vaccins chez le singe en faisant suivre leur injection par voie intramusculaire d'une série de brèves impulsions électriques (procédé dit «d'électroporation»). Il sera intéressant de voir si l'on peut reproduire ces résultats chez l'homme. Une étude de Phase I a été lancée chez des sujets volontaires à cet effet.

1.8.1.2. Cellules dendritiques « pulsées » par les antigènes

De nombreuses études ont montré la capacité des cellules dendritiques (CD) pulsées *ex vivo* à présenter les antigènes peptidiques aux lymphocytes T naïfs. Il en résulte une induction de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des antigènes peptidiques (43). Un essai clinique préliminaire basé sur la stimulation *ex vivo* des DC autologues par des particules VIH autologues inactivées a été récemment mené (78). Dix huit patients chroniquement infectés ont été immunisés. Les résultats très encourageants ont montré une baisse significative de la charge virale de plus de 90% et prolongée pendant au moins 1an chez près de la moitié des sujets. La suppression virale était positivement corrélée avec l'expression d'interféron gamma par les lymphocytes T CD4+ mais elle fut de très courte durée (84 jours). L'application de cette stratégie coûteuse pour le traitement de millions d'individus infectés ne paraît actuellement pas plausible (3)

1.8.2. Les vaccins inducteurs d'anticorps neutralisants

L'administration de hautes doses d'anticorps monoclonaux neutralisants chez le singe protège l'animal contre l'infection expérimentale avec un virus hybride SIV-VIH («SHIV»), y compris par voie vaginale. De même, les anticorps anti-V3 induits chez le chimpanzé par une vaccination avec de la gp120 protègent l'animal contre une infection par des souches du VIH (X4) homologues (54). Les anticorps neutralisants sont donc protecteurs. Malheureusement, aucune préparation de vaccin ne s'est encore révélée capable d'induire avec efficacité des anticorps neutralisants à large spectre indispensables à la protection contre l'infection par les souches sauvages (R5) du virus, qu'il s'agisse de vaccins à virus entier inactivé, de vaccins à base de molécules de gp120 monomériques ou de gp120/gp41 (gp140) trimériques, de vaccins vivants recombinants exprimant ces mêmes antigènes ou de vaccins peptidiques. C'est très vraisemblablement, d'ailleurs, ce qui explique les échecs des deux études cliniques de Phase III du vaccin à base de gp120 réalisées par Vaxgen au début des années 2000 (29). L'incapacité d'induire avec les vaccins existants des anticorps neutralisants de classe IgG anti-b12, 2G12, 2F5 ou 4E10, tient probablement au fait que les épitopes qui leur correspondent sont dans des régions cryptiques ou masquées et ne sont peut-être exposés que de façon transitoire à la surface du virus au moment de son interaction avec les récepteurs CD4 et CCR-5. Une étude a montré que les épitopes de neutralisation de la gp120 sont en partie masqués aussi par le bouclier de sucres («*glycan shield*») qui hérissé la surface de la gp120, où il peut d'ailleurs adopter une configuration variable (144), ainsi que par les boucles hypervariables V2 et V3 de la molécule. Les anticorps 2F5 et 4E10 montrent pour une réactivité croisée non négligeable avec la cardiolipine et d'autres phospholipides (62). Ce mimétisme partiel avec des antigènes du soi pourrait expliquer la rareté de ces anticorps chez les patients infectés par le VIH et l'impossibilité de les induire par immunisation active. Plusieurs approches ont été développées pour essayer de contourner ces obstacles, notamment l'emploi comme immunogène de gp120 amputée de ses boucles hypervariables V1 et/ou V2 («gp120 Δ V2»), complexée avec du CD4 ou avec un analogue synthétique du CD4, stabilisée dans sa structure tridimensionnelle par création de ponts disulfures avec la gp41 («protéine SOS») ou présentée sous forme de pseudo-virions («VLP»). Aucune de ces préparations ne s'est cependant encore avérée capable d'induire des taux élevés d'anticorps neutralisants à large spectre.

Très récemment, une étude vaccinale basée sur la gp41 a été publiée par l'équipe de M.Bomsel à Paris en collaboration avec la société Suisse Mimetics. Ce vaccin est basé sur l'utilisation de la sous-unité de la gp41 (peptide P1 et protéine rgp41) comme un antigène greffé sur des particules de type virosomes. Cette étude a été réalisée sur trois groupes de singe, chaque groupe contient 5 singes). Le premier groupe (contrôle) a été immunisé par les virosomes par voie intramusculaire (im) seulement, le deuxième groupe a été immunisé par le peptide P1 et la protéine rgp41 par voie intramusculaire et le troisième groupe a été immunisé par le peptide P1 et la protéine rgp41 par voie intramusculaire et intranasale (im, in). Il a été démontré que la combinaison des voies intramusculaire et intranasale (groupe trois), offre la meilleure protection pour les singes après administration de (SHIV)-SF162P3 avec une charge virale indétectable pendant six mois dans 5/5 animaux, sauf qu'il a été détecté une faible charge virale transitoire qui a duré une semaine chez un seul singe, par rapport à la protection de 50% pour les singes vaccinés par voie intramusculaire seulement (12).

4/5 animaux vaccinés sont restés séronégatifs vis à vis du (SHIV)-SF162P3 et le cinquième a été infecté. Toutes les IgA vaginales spécifiques de la gp41 provenant des animaux protégés bloquent la transcytose et les IgG vaginales spécifiques de la gp41 possèdent des activités neutralisantes et/ou à activité ADCC. Les IgG sériques manquaient totalement d'activité neutralisante.

B – ETUDES EXPERIMENTALES

1 - Introduction

L'objectif majeur de cette thèse est de préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe de fusion :

- La première approche était la production d'anticorps humains par la technique de phage display et dans ce but nous avons réalisé une étude préliminaire afin de préciser l'existence et l'importance des IgG dirigées contre le complexe de fusion sur une cohorte de 85 patients VIH séropositifs afin de sélectionner les PBMCs de patients infectés contenant ces anticorps.

Nous n'avons pas pu assembler la chaîne légère et la chaîne lourde de l'anticorps par la technique PCR et nous nous sommes aperçus qu'il est trop compliqué de fabriquer un anticorps bien configuré en utilisant cette technique.

Nous avons ensuite décidé de générer ces anticorps par la technologie des hybridomes chez la souris.

- La deuxième approche consiste à préparer des anticorps monoclonaux à partir de souris immunisées avec le complexe HR1/HR2 représenté par une lignée stable exprimant la gp41 dans un contexte conformationnel.

L'analyse des propriétés des anticorps a été faite en utilisant des tests bien définis d'inhibition de fusion et d'infection virale.

2 - La technique du phage display

Nous avons d'abord essayé de mettre au point cette technique pour préparer des anticorps dirigés contre le complexe HR1/HR2, mais sa complexité nous a conduits à y renoncer.

2.1. Recherche des anticorps

Les peptides obtenus auprès du « AIDS Research and Reference Reagent Program » (NIH, NIAID) ont été fixés sur des plaques ELISA. Ces peptides ont des structures linéaires chevauchantes mimant la gp41. En outre, le complexe N36/C34 a été formé et fixé sur la plaque. Les sérums qui reconnaissaient les peptides HR1 ou HR2 isolés ont été éliminés.

86 patients ont été testés pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre le complexe de fusion entier. 30% des patients séropositifs possédaient des anticorps dirigés contre le complexe HR1/HR2. Les anticorps dirigés contre le complexe ont été purifiés en utilisant différentes protéines recombinantes et des peptides. Il s'agissait de MBR-HR1 de la souche LAI et du peptide C34 de la souche IIIB. Les IgG des sérums ont été purifiées par une chromatographie échangeuse d'anions.

2.2. Purification des IgG du sérum

La résine d'amylose a été saturée avec la protéine recombinante MBP-HR1 pendant 1 heure, puis le C34 a été rajouté pour bien former le complexe. Ce mélange a été déposé sur la colonne puis rincé avec du tampon de lavage. Les sérums dilués ont été déposés sur la colonne. Ceci a permis la fixation sur la colonne des IgG dirigées contre le complexe. Une étape de rinçage avec du tampon a été réalisée afin d'éliminer les immunoglobulines qui ne se sont pas accrochées sur la colonne. A la fin, les IgG dirigées contre le complexe ont été éluées. Ces anticorps purifiés ont ensuite été dosés par une technique d'ELISA Sandwich.

La capacité de ces anticorps à neutraliser l'infection sur le modèle LAI/SupT a été étudiée. Les résultats obtenus montraient qu'ils étaient neutralisants.

2.3. Technique du phage display

Nous avons essayé de fabriquer une librairie génétique à partir de leurs ADNc en utilisant la technique phage display. L'idée est de combiner au hasard les ADNc des chaînes lourdes et légères correspondant aux lymphocytes B provenant des patients séropositifs contenant les anticorps anti-HR1/HR2. Ces combinaisons doivent être clonées ensemble au hasard dans le gène III d'un bactériophage filamenteux M13 en fusion. La construction de banques combinatoires de régions VH et VL humaines sont exprimées à la surface du phage. Les ADNc codant les chaînes lourdes et les chaînes légères sont amplifiés par PCR. Les chaînes lourdes et les chaînes légères, sont ensuite associées. Le fragment produit est formaté de façon à coder des fragments d'anticorps de type Fab et clonés alors dans des phages ou des phagémides. Ce clonage permet d'insérer les ADNc en amont d'une séquence codant une protéine de l'enveloppe du phage (g3p ou, moins fréquemment, g8p quand il s'agit de phagémides). Cette technique consiste à faire exprimer la protéine-cible à la surface d'un bactériophage non lytique. Ces phages sont utilisés pour infecter des bactéries E.coli. Les phages sont récupérés dans le surnageant de culture et sélectionnés en fonction de la protéine voulue. Ces banques représentent donc un répertoire d'anticorps correspondant à un nombre de combinaisons aléatoires. La rapidité de sélection de fragments par cette technique a été initialement une des raisons de son développement. La sélection peut se faire de différentes façons en fonction des caractéristiques de la protéine-appât. Les clones sélectionnés sont utilisés pour réinfecter des souches bactériennes, les surnageants sont récupérés et resélectionnés contre la protéine. En répétant cette étape de sélection plusieurs fois, on enrichit la population en clones les plus spécifiques de l'appât. Ces candidats sont alors clonés et séquencés

La fixation de la protéine-cible sur un support peut se faire de différentes façons :

- Fixation directement sur un support activé
- Colonne d'affinité si la protéine est taguée ou biotinylée

La technique de phage display présente de nombreux avantages :

- Le lien entre phénotype et génotype
- La grande diversité des protéines variantes apparaissant dans une seule bibliothèque et la flexibilité de sélection qui peuvent être réalisées *in vivo* ou *in vitro*.

Les limitations du système sont la taille des répertoires et de la maturation *in vitro*. Les fragments d'anticorps isolés à partir de banques construites en utilisant de l'ADNc provenant de donneurs (banques « naïves ») se sont avérés posséder une affinité peu élevée. La construction de banques est un investissement important. Dans le cas où des répertoires particuliers ne sont pas requis, il semble plus judicieux d'obtenir des banques « prêtes à l'emploi » déjà construites qui sont distribuées par les laboratoires de recherche.

Nous ne sommes pas parvenus à générer des Fab par « Nested PCR ». On n'a pas pu assembler les chaînes lourdes et les chaînes légères bien que nous ayons essayé d'optimiser les conditions de PCR en changeant plusieurs facteurs comme la température d'hybridation, le nombre de cycles, les quantités de l'ADN matrice et des amorces.

Cette approche nous est apparue trop compliquée et mal adaptée car nous n'avons pas pu assembler les chaînes lourdes et les chaînes légères et nous avons entrepris une autre démarche expérimentale.

2.3.1. Protocole expérimental

Dans la première étape de PCR, les régions variables de la chaîne légère ont été amplifiées à partir de l'ADNc en utilisant les amorces sens V_L qui rajoutent une queue permettant le clonage dans le vecteur et la superposition de V_L et C_L dans la deuxième étape de PCR.

La région constante de la chaîne légère C_L a été amplifiée à partir d'un vecteur fourni dans le kit.

Les régions variables de la chaîne lourde ont été amplifiées à partir de l'ADNc en utilisant les amorces V_H antisens qui rajoutent la séquence de la région C_{H1} aux produits V_H de la PCR permettant la superposition des fragments V_H et C_{H1} dans la deuxième étape de PCR. Les amorces sens V_H ont une queue de séquence correspondant à l'extrémité 3' du fragment C_L

permettant la superposition entre le fragment de la chaîne lourde et de la chaîne légère dans l'étape finale de la PCR.

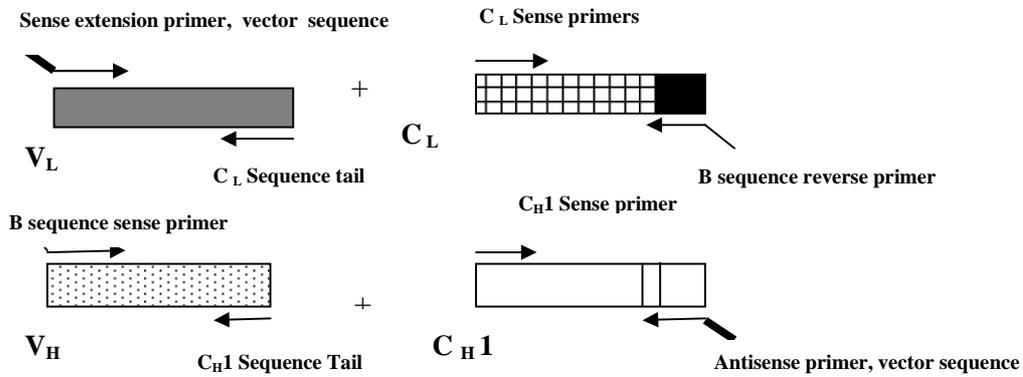
Les régions constantes de la chaîne lourde sont amplifiées à partir d'un plasmide contenant un Fab cloné humain fourni dans le kit.

Dans la deuxième étape de PCR, les fragments complets de chaînes légères sont construits à partir de la superposition des fragments V_L et C_L en utilisant l'amorce d'extension sens V_L et l'amorce inverse qui est spécifique de l'extrémité 3' du C_L produit. Les fragments complets de chaînes lourdes sont construits à partir de la superposition entre les fragments V_H et C_{H1} par PCR de chevauchement et d'extension en utilisant l'extension de l'amorce sens V_H , qui est spécifique de la séquence de la queue B introduite dans la première étape de PCR, et l'amorce inverse C_{H1} , qui est spécifique de la séquence du vecteur.

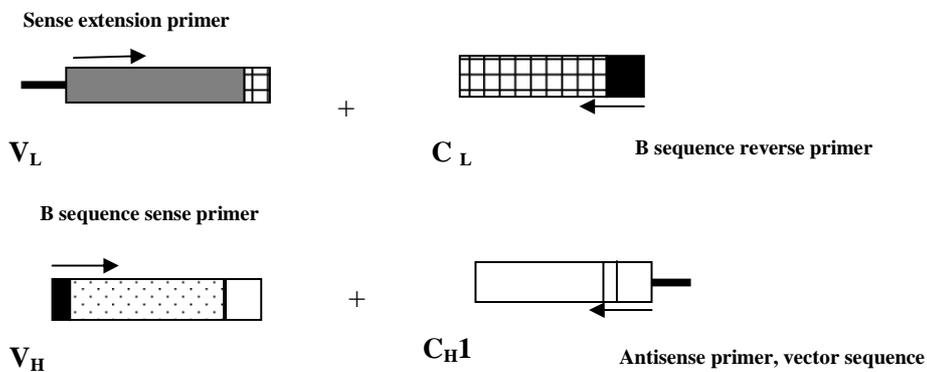
Dans l'étape finale de PCR, afin de générer le produit Fab, les produits purifiés de la chaîne légère et de la chaîne lourde sont amplifiés avec une amorce d'extension sens V_L et une amorce d'extension inverse.

Stratégie de fabrication des anticorps monoclonaux humains par Phage display

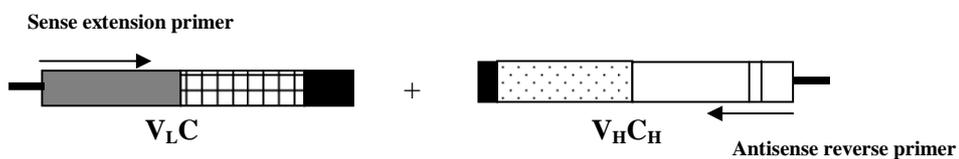
1- First Round PCR



2- Second Round PCR (First overlay PCR)



3- Third Round PCR (Second overlay PCR)

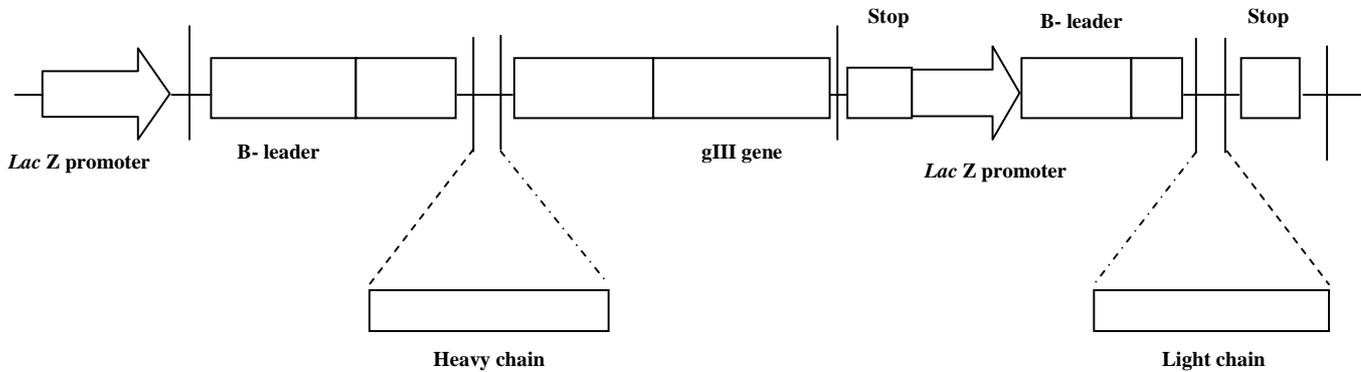


4- Final Fab Products for cloning



Génération du fragment Fab par PCR d'extension et de superposition afin de l'insérer dans le système pComb3X.

Représentation schématique du vecteur pComb3X utilisé dans la construction des bibliothèques d'anticorps.



Il est conçu pour exprimer des fragments d'anticorps à la surface de phages filamenteux. Les fragments d'anticorps sont fusionnés au domaine carboxy-terminal de la protéine d'enveloppe III et sont exprimés à la surface de la particule du phage.

2.3.2. Etude préliminaire

- Le criblage des IgG anti HR1/HR2 chez les patients

86 sérums ont été étudiés pour tester la présence des anticorps anti-HR1/HR2 en utilisant les peptides du NIH qui couvrent la région gp41. Ces peptides ont des structures linéaires chevauchantes mimant la gp41. En outre, le complexe N36/C34 a été formé et fixé sur la plaque.

MN	UG	4753	4754	4755	4756	4757	4759	N36	C34	T20	N/C
35%	30%	0%	0%	0%	18%	20%	85%	10%	20%	22%	30

Reconnaissance des peptides par le sérum de patients VIH-1 séropositifs

Les résultats présentés dans le tableau montrent que 30% des patients ont des anticorps contre le complexe sans en avoir contre le N36 et le C34.

- Le test de neutralisation

Les anticorps IgG purifiés à partir des patients ont été testés pour leur capacité neutralisante sur le modèle LAI/Sup T1.

No. du patient	618	539	584	654	680	795	796	800	804
% d'Inhibition	54%	58%	59.75%	57.5%	61%	57.5%	72.5%	74.5%	70%

Une étude récente a montré qu'une grande proportion de patients VIH+ possèdent des anticorps contre la structure de six hélices représentant le complexe de fusion (100). L'existence d'anticorps dirigés contre le complexe dans le sérum des patients constitue la première preuve que la conformation « coiled coil » de la gp41 existe *in vivo* (57). Certains anticorps monoclonaux humains dirigés contre le complexe ont été décrits comme ayant une faible activité neutralisante contre les isolats primaires (55).

En outre, des anticorps polyclonaux dirigés contre des peptides représentant le complexe N36/C34 possèdent une activité inhibitrice de la fusion cellulaire et une activité bloquante de l'entrée du virus (64).

Les résultats obtenus dans cette étude nous confirment que la gp41 est un bon immunogène parce qu'elle est bien reconnue par les patients et induit une réponse neutralisante. Cependant, tous les anticorps anti-gp41 décrits ne protègent pas parce que l'anticorps a été administré lors d'une infection établie.

3 - Les nouveaux objectifs

L'interaction gp120/ récepteurs cellulaires entraîne un changement de conformation de la sous unité gp41 pour former un intermédiaire de fusion. Cet intermédiaire est dû à la formation d'un complexe entre deux régions, l'une appelée HR1, proche du peptide de fusion, l'autre appelée HR2 située juste avant la région transmembranaire. La formation du complexe HR1/HR2 est une étape essentielle pour rapprocher les membranes virale et cellulaire. Le complexe ne semble exposé efficacement que de manière transitoire au moment de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

Des peptides inhibant la formation de ce complexe sont de puissants antiviraux. Parmi ces peptides, un peptide de 34 acides aminés, appelé T20 représentant une partie de la région HR2, est utilisé comme antiviral chez les patients infectés par le VIH-1. Différentes études suggèrent qu'il existe des anticorps neutralisants dirigés contre ce complexe. Les régions de la protéine d'enveloppe impliquées dans le processus de fusion sont en outre très conservées parmi les souches VIH-1. Le complexe de fusion est donc une cible qui semble intéressante pour le développement d'un vaccin anti-VIH-1. Une étude préliminaire sur une cohorte de 80 patients VIH-1 séropositifs montre que seulement quelques sérums sont capables d'inhiber la fusion virus/cellule.

La neutralisation des virus par des anticorps peut avoir des applications cruciales si elle vise les premières étapes, au niveau du contact virus-cellules. On a réussi à relever le défi en produisant de la gp41 recombinante qui est capable de stimuler des anticorps neutralisants avec la même spécificité que la gp41 virale.

L'objectif de cette thèse est de préparer des anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre le complexe de fusion.

Tous ceux qui ont été décrits aujourd'hui sont dirigés contre des épitopes linéaires et sont faiblement actifs. Il était nécessaire d'élaborer un immunogène conformationnel. Nous avons voulu nous rapprocher au maximum de la situation physiologique et pour cela nous avons choisi de travailler avec une ligne cellulaire humaine exprimant l'ectodomaine de la gp41 et la partie transmembranaire de façon stable. La validation de cette lignée a été évaluée en utilisant tous les anticorps anti-gp41 décrits (2F5, 4E10, Z13, 3D6, 5F3, D5 et NC-1). Cette lignée stable est capable d'induire la production d'anticorps spécifique par immunisation.

L'activité neutralisante des anticorps des surnageants d'hybridomes sera testée sur les souches de laboratoire LAI et BAL et sur des isolats primaires.

4 - L'Article

Generation of HIV-1 potent neutralizing antibodies by immunization with conformational HR1/HR2 fusion complex

Dawood R¹., Pin J.J.²., Vincent N³., Benjelloun F¹., Kone A¹., Chanut B¹., Verrier B³., Moog C⁴., Genin C¹ and Paul S¹.

¹ GIMAP EA3064, Faculté de Médecine de Saint Etienne, Université de Lyon, France

² DENDRITICS SAS, Bioparc Laennec, Lyon, France

³ Institut de Biologie et Chimie des Protéines, FRE 3310 CNRS/UCBL, Lyon, France

⁴ INSERM-U748, Institute of Virology, Strasbourg, France.

Corresponding author: Dr Stéphane Paul (stephane.paul@chu-st-etienne.fr)

Abstract

The envelope glycoprotein is the main target for human immunodeficiency virus (HIV) vaccine design. The N-terminal and the C-terminal regions of the gp41 interact each other to form six helix bundle which is responsible for the fusion between the viral and the target cell membranes. Monoclonal antibodies (mAbs) able to disrupt the formation of the six helix bundle could inhibit the HIV fusion. During the last decade, several human mAbs of potent antiviral capacity to neutralize primary isolates of different clades have been developed. The most broadly neutralizing mAbs were screened from HIV-1 seropositive patients and recognized linear epitopes within the membrane proximal region of gp41. In this study, we developed a stable transfected eucaryote cell line expriming a well folded complex. Three mAbs against HIV-1 gp41 were produced in mice. Our results show that the three mAbs were able to neutralize HIV-1. Two of the mAbs bound to a recombinant folded gp140 and recognized HR1/HR2 regions while one of them recognized linear epitope within the HR2 region. Interestingly, the results showed that the three mAbs could inhibit syncytium formation and block the interaction between the HR1 and the HR2 region to form a complex.

Keywords: Antibody, Neutralizing, Fusion complex, gp41, HR1/HR2

INTRODUCTION

A major challenge in HIV-1 vaccine research remains to identify an immunogen that has the capacity to induce high titers of broadly neutralizing antibodies. HIV-1 neutralizing Abs target the envelope glycoprotein (Env) spikes on the surface of infectious virions.(17)

The HIV-1 envelope glycoprotein consists of two noncovalently associated subunits, gp120 and gp41. The gp120 surface protein is responsible for the interaction of the virus with CD4 receptor and subsequently with chemokine coreceptor (CCR5 or CXCR4) on the surface of the target cell. Receptor binding induces conformational changes in the gp41 transmembrane domain subunit. The mechanism of fusion involves two helical regions of gp41, the N-terminal heptad repeat (NHR) and the C terminal heptad repeat (CHR), which associate to form a fusion active « trimer-of hairpins, » a common structure in the fusion mechanism of many enveloped virus(13-10). This structure consists of a bundle of six α -helices, in which three CHR peptides pack in an antiparallel manner against a central three- stranded coiled-coil formed by the NHR regions of the same gp41 monomers(4-7-21). This structural transition is thought to bring the virus and cell membrane into close proximity leading to fusion pore formation and membrane fusion (32).

The induction of a potent gp41 specific neutralizing antibody (nAb) response remains one of the principal goals in HIV-1 vaccine development, since it has a relatively conserved sequence and less glycosylation sites than gp120, which is considered to be able to prevent HIV-1 infection by interfering with post attachment steps leading to virus membrane fusion. Interestingly, the most broadly neutralizing monoclonal antibodies previously described (2F5, 4E10, Z13, 3D6 and 5F3) were screened from HIV-1 seropositive donors and recognize linear epitopes within the same continuous membrane proximal region of gp41(1,3,5,20,25). 2F5 is mapped to the conserved sequence ELDKWA (27), whereas 4E10 and Z13 recognize an epitope involving the sequence NWF(D/N)IT, which is located on the C terminal domain of the 2F5 epitope (33). The monoclonal antibody 3D6 recognized a 17 amino acid region in the HIV-1 gp41, its epitope involving the sequence (GCSGKLICTTAVPW)(9). The 5F3 recognize an epitope involving the sequence (QNQQEKNE). The 5F3 and the 3D6 are located upstream to the MPER region.

Human mAbs targeting gp41 exhibit broader neutralizing activity than those targeting gp120, as 2G12 and b12 because of the high variability and glycosylation of HIV-1 envelope glycoprotein

surface subunit gp120 (31). The HR1/HR2 complex located in gp41 seems particularly immunogenic as antibodies against that structure can be generated in rabbit injected with HR1/HR2 peptide mixture without carrier molecule (11,15). Since linear peptides comprising both structures are immunogenic but do not induce neutralizing antibodies, several strategies to constrain the recognized antigen conformation have been developed. The HR1/HR2 regions of gp41 being conserved well among HIV isolates possibly to preserve their capacity to form a complex. Antibodies directed to the HR1/HR2 complex exist in the sera of HIV-1 infected individual and monoclonal antibodies capable of recognizing HR1/HR2 complexes have been generated from B cells of HIV-1 infected patients (18). The specific HR1/HR2 antibodies purified from sera seem to have moderate HIV-1 blocking capacity.

In the our laboratory, the antibodies directed to the HR1/HR2 complex were purified from sera by affinity chromatography using maltose binding protein (MBP)-HR1/C34 and these antibodies have anti-HIV biological activities. Neutralization of HIV-1 were performed using HIV-1 primary isolates from different clades A (92RW008), B (92BR014 and 92TH014), C (98TZ017), D (92UG024 and 93UG082), E (92TH001) and these antibodies were demonstrated as broadly neutralizing (35).

In this study, we focused on eliciting neutralizing antibodies that target the fusion complex. We constructed and expressed a recombinant gp41 in HEK 293 eukaryotic cells that could represent the native target for producing monoclonal antibody. After immunization of mice with gp41 expressing human cells, hybridoma were generated and screened for their ability to recognize conformational gp41 expressing cells. We have characterized three different IgG antibodies with high capacity to block the fusion complex and to neutralize HIV-1 infection.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The following materials were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pSVIII-93BR025.9 plasmid (Gene Bank number:U09126), primary HIV-1 isolates (SF162, 92US660, and 93BR025), the SHIV 89.6P

Subtype B env (15-mer)Peptides Complete Set, NC1, 2F5, 5F3 mAbs and the CHO-WT cell line. Gp140 recombinant protein (MCN96, clade C) and 3D6, 4E10, Z13 mAbs were obtained from Polymun Scientific (Vienna, Austria). D5 mAbs was kindly provided by Dr Miller (Merck & Co, NJ, USA). Human HEK293 and Hela CD4, cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). SP2/0 cells were obtained from (Dendritics, Lyon, France)

Cloning of gp41

The plasmid pSVIII-92BR025.9, containing the full sequence of HIV-1 envelope protein, clade C was used as a template for the amplification of the HR1-PID-HR2 with and without the gp41 transmembrane region by using the designed primers mentioned in Table 1. The PCR products were purified by Qiagen purification kit (Courtaboeuf, France). Purified PCR products were digested with SmaI/PstI and cloned in the p-display expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). The cloned PCRs were then transformed into E.coli strain DH5 α using thermal shock method followed by extraction and purification using Qia-prep Miniprep kits (Qiagen) and large scale Midiprep kits, (Qiagen). Fidelity of the constructs was verified by enzymatic digestion method and by automated DNA sequencing. Use of the p-display expression vector allows the expression of the c-myc tagged gp41 glycoprotein at the cell membrane.

Establishment of gp41 expressing cell line

HEK 293 cell culture was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium with stable L-glutamine and high glucose level (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, US) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1X non essential amino acids at 37°C with 5% CO₂. Transfection was made with LYOVEC (Invitrogen) as according to the manufacturer's recommendation. The selective agent G418 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, US) was added to a final concentration of 0.5 mg/ml 48 h after transfection. After 10 of selection, tranfected cells were analyzed by immunofluorescence. Then , limiting dilution of transfected cells has been made. The validation of the 293-gp41TM cell line was performed by flow cytometry and by immunoflourescence.

To test the expression of the gp41 at cell surface by flow cytometry, the 293-gp41TM cells were tested with different anti-gp41 human monoclonal antibody Z13, 2F5, 5F3 at 5µg/ml for 30 min at 4°C. The cells were washed three times with FACS buffer and then incubated with R-Phycoerythrin R-PE goat anti-human IgG (Sigma) for 30 min at 4°C. After washing, cells were analyzed by flow cytometer. At least, 10,000 events were analyzed on FACScan.

The anti-gp41 mAbs (3D6, 2F5, and 4E10) were used at 15ug/ml for the validation of the cell line by indirect immunofluorescence and using the anti-myc conjugated with FITC for direct immunofluorescence followed by a second step with FITC conjugated goat anti-human IgG. The visualization of labeling was observed by fluorescent microscopy software (Nikon TE2000 Microscope, Burlingame, CA, US) using NIS-Elements software.

Immunization of mice and monoclonal antibody production

BALB /c mice (6-8 weeks old, n= 3) were intraperitoneally immunized with 4×10^6 cells of 293-gp41TM on complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma Aldrich) followed by three boosts again with 4×10^6 cells with incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Sigma Aldrich) at 14, 22, 28 days post-immunization, respectively. All mice were sacrificed 3 days after the last boost. The splenocytes were fused immediately with myeloma cells SP20 by using polyethylene glycol-1000 as fusion reagent (15). The hybridoma cells were cultured in DMEM-F12-Glutamax medium supplemented with 10% horse serum (Gibco), 0.1Mm hypoxanthine, 0.5% azaserine, 100U/ml penicillin and 100ug/ml streptomycin in 96-well plates, until that the colonies of hybridoma cells were grown. Initially, the hybridoma cells were diluted in round bottom 96- well plates by limiting dilutions to obtain 1-10 cells per well and cultured for 7 days.

Specificity of mAbs by ELISA assay

The specificity and reactivity of hybridomas were measured by ELISA against 293-gp41TM cell line to identify the specific antibody producing clones. Briefly, the 293-gp41-TM cells were cultured for 2 days in 96-well plates and fixed in cold acetone. Then, hybridoma supernatants were harvested after 6-days, and then incubated for 30min on fixed 293gp41TM cells. Antibody binding

was then revealed with with peroxidase conjugated –sheep anti-mouse IgG (Biosys) at a 1:200 dilution in PBS for 30 min at 37°C. The substrate o-phenylenediamine di hydrochloride (OPD) substrate (Sigma) was added to plate. Optical density was measured at 492nm. Forty clones were selected, exhibiting a strong reactivity against the cell line. Positive clones showing neutralization activity were expanded using a high density culture system(Integra cell line CL1000; Integra Biosciences) (Abbott lab., Abbott Park, IL, US)(31). After Sodium sulfate precipitation, the mAbs were purified by anion exchange chromatography on a Hyper-D column and peroxidase labeled (Sepracar) .

Analysis of the mAbs specificity by flow cytometry

To test the binding specificity of the generated antibodies, we used flow cytometry to analyze cl1, cl2, and cl3 directed to gp41 expressed cell line. Cells were separated from the culture flasks using versene buffer (GIBCO, GrandIslandNY, USA). The cells were washed twice with RPMI 1640 without phenol red containing 5% horse serum and 0.1% sodium azide (FACs buffer). Gp41 expressed cells (1×10^6) were incubated with 100 μ L of the three generated antibodies at 15 μ g/ml for 30 min at 4°C. Cells were washed and incubated with 100 μ l fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat anti-mouse IgG (diluted 1:10,000 in FACs buffer) for 30 min at 4°C. Subsequent to washing, the cells were analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

Virus neutralization assays

Neutralizing activity of supernatants or of purified IgG was performed using laboratory viral strains, BAL subtype B and LAI subtype B and primary isolates of clades B (SF162, 92US660 and QHO) and C (93BR025). Each assay was performed subtype B in duplicate and repeated at least twice.

In the case of laboratory viral strains, SupT1 cells which contain CD4 and CXCR4 were incubated at 37°C in 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% heat –inactivated fetal calf serum. Infection was performed in 96 well rounded bottom plates. Hybridoma supernatants

(50 µL) were incubated with an equal volume of virus containing 100 tissue culture infective dose for 2 h at 37°C and then added to 100 µl of SupT1 cells (3×10^5 /well). The next day, the cells were washed twice with tissue culture medium. The supernatants were collected 7 days post infection for p24 measurement. (Advanced Bioscience Laboratories, Inc.)

Neutralizing activity of purified antibodies on infection by primary HIV-1 isolates was determined as previously described (32). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors and stimulated with phytohemagglutinin (5µg/ml) and 200 U/ml of recombinant human interleukin-2 (Abcys, Paris, France). The cells were infected with HIV-1 at TCID50 in the presence of serially diluted antibody. The supernatants were collected 14 days post-infection for p24 measurement. (Advanced Bioscience Laboratories, Inc.)

While in the case of BAL which is a laboratory viral strain, the PBMCs were treated as described in the previous paragraph. The mAbs with different concentration were incubated with the BAL virus for 2h at 37°C and then the PBMCs were added. After 48h, the cells were washed twice. The supernatants were collected 7 days post-infection for p24 measurement.

The percent neutralization was calculated as reduction of p24 compared with the control value of p24 with no antibody.

IC50 and IC80 were the antibody concentration that conferred 50% and 80% neutralization respectively.

Epitope mapping of mAbs

ELISAs were carried out using the SHIV 89.6P(subtype B) env peptides complete set which cover and overlap all the area of gp41 with 15-mer. Briefly, each individual peptide was coated on a 96 well plate (Maxisorp, Nunc) at 5µg/ml in 0.1 mol/l sodium carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. The plates were washed with tris-buffered saline (TBS) (144 mmol/l NaCl, 25 mmol/l Tris – HCL, pH 7.5) containing 0.5% tween 20 and blocked with the same buffer and 2% BSA for 1 h at 37 °C. After washing, 100µl of our generated antibodies (5µg/ml) diluted in TBS were added to the wells and incubated 2 h at 37°C. After washing, the detection was done by using horseradish peroxidase HRP- conjugated goat anti-mouse IgG and OPD substrate. The measurement of

absorbance was read at 492 nm. All assays were performed in duplicate.(Multiskan Microplate Photometer, thermo scientific)

HIV Envelope mediated cell-cell fusion assay

4×10^5 chinese hamster ovary (CHO) cells (target cells) stably transfected with HIV-1_{HXB2} Env expressing vector pEE 14 (CHO-WT) (Env cells) were added in each well of 24-well culture plate in glutamine-deficient minima essential medium (GMEM-S) containing 400 $\mu\text{mol/L}$ methionine sulfoximine (Gibco, GrandIsland NY,USA) and then the monoclonal antibodies for test at different concentrations were added into the wells and mixed adequately. After incubation in 5% CO_2 at 37°C for 4 hr, 4×10^5 Hela CD4 cells were added to each well. The plate was incubated in 5% CO_2 at 37°C. After 22 h incubation, syncytia were stained by Giemsa and counted under microscope. The numbers of syncytia was calculated at five different fields in a well.

Inhibition of fusion complex formation

The protein HXH2 (clade B) which representing the region HR2 and the protein HUG24H1 (clade C) representing the region HR1 were produced in E.coli and purified as previously described in (35).

To measure the ability of mAbs to block HR1/HR2 complex formation, a specific ELISA assay was developed. A Ni-NTA HisSorb plate (Qiagen) was coated with purified HR2 (500 $\mu\text{g/ml}$) at room temperature for 2h. The purified HR1 (200 $\mu\text{g/ml}$) was mixed with the mAbs at 37°C for 45 min. The mixture was then added to wells followed by adding D5 anti-gp41 and horseradish peroxidase HRP-conjugated goat anti-human IgG and OPD substrate sequentially. The absorption at 492 mm was measured.

RESULTS

We have decided to construct a human cell line which allows the expression of a natural conformational membrane-bound gp41 as present in viral particles.

Construction of the human 293-gp41TM cell line

The HR1-PID-HR2-TM was amplified on the plasmid pSVIII-92BR025.9 with specific primers (Fig1 and Table 1). The HR1-PID-HR2 fragment encode a fragment of 531 base pairs or 177 amino acid residues which has been cloned in frame into pdisplay vector and verified by DNA sequencing. The recombinant plasmid was then used to transfect the human 293 cell line as described in the method section. After antibiotic selection, a clonal dilution was realized at 0,5 cell/well and around 50 individual clones were analyzed. We have selected one very interesting clone with an high level of gp41 expression both on the surface and in the cytoplasmic content of the 293-gp41TM transfected cell line (Fig 2A). Conformational expression of gp41 was demonstrated by specific labeling of 293-gp41TM cell line with the well known gp41-specific IgG (Z13, 2F5, and 5F3) as shown in Fig 2B. Any fluorescence was observed on the negative control NC-1 and D5 mAbs were used to assess the conformational form of gp41 in 293-gp41TM cell line as shown in Fig 2C. NC-1 is a murine monoclonal antibody that specifically recognizes the six helix bundle core of the HIV-1gp41. It is a conformational non neutralizing antibody. While the D5 was identified as antibody directed against the highly conserved hydrophobic pocket in the groove formed by the trimeric coiled coil of the gp41 N-helices. We observed that 50% of the 293-gp41TM were stained by using the NC-1 while 13% of cells were stained by using of D5.

Specificity of the three monoclonal antibodies by flow cytometry and ELISA

The 293-gp41TM cell line was used to immunize Balb/C mice as described in the method section. Three different immunization were made to obtain 200 hybridoma clones. Hybridomas were tested for their reactivity against 293 or 293-gp41TM cells. Culture supernatant of confluent clones were used by immunofluorescence. Among the 200 clones obtained, supernatant of 40 clones exhibit a strong specific reactivity against the 293gp41TM cell line.

The supernatant of these 40 clones were then used to evaluate their neutralizing activity in a simple neutralizing LAI/SupT1 assay. Briefly, diluted supernatant were added to the LAI virus and we have measured the neutralizing activity after 7 days of infection. Among the 40 clones, three clones exhibit a strong neutralizing activity against the model LAI/SupT1. 50ul of supernatant was used for each clone which leading to have 85 of neutralization.

The three clones were amplified and used to produce high quantity of each specific antibody as described in the method section. Culture supernatant were pooled and used to purify specific IgG on a Hyper-D column. Purity of the antibody was estimated higher than 95%.

Specificity of the mAbs produced by the different hybridomas was measured by flow cytometry on 293-gp41TM and by specific ELISA assay. The use of 5 µg/ml of each three interesting Mabs allows the detection with a great efficiency of gp41 on the cell surface of 293-gp41TM (Fig. 3). 21%, 61%, 65% of the 293gp41TM cells were stained by using cl, cl2, cl3 respectively. The expression pattern obtained with Cl1, 2 and 3 are very similar with those obtained by the use of 2F5, 3D6 and Z13 mAbs. We have also confirmed the specificity of the three mAbs by cell-coated ELISA with the 293-gp41TM cell line (data not shown).

Virus Neutralization of the three monoclonal antibodies against primary HIV-1 isolates from different clades

To investigate the neutralizing effect of the antibodies, we tested their activity with the laboratory strains (LAI, BAL) and with primary HIV-1 isolates of clade B (SF162, QHO692 and 92US660) and clade C (92BR025) in neutralization assays based on infection of PBMCs and measured p24 produced by infected cells. The overall results of neutralization of the different virus strains are shown in Table 2. All the three antibodies had neutralizing activity against the laboratory strains.

The cl1, cl2 and cl3 neutralized the LAI virus with IC80 at 0.78 µg/ml, 12.5 µg/ml, 1.5 µg/ml respectively. We observed with BAL that cl1 and cl2 neutralized with IC80 at 12.5 µg/ml, while at 25 µg/ml for cl3. The results also demonstrate their ability at inhibit three primary isolates with IC80 at 0.78-25µg/ml

Our data suggest that the three monoclonal antibodies appear to inhibit a broad spectrum of clinical HIV-1 isolates mostly from subtype B ranging from 0.78 up to 100 ug/ml depending on the virus strain and the antibody.

Mapping of binding sites of the three monoclonal antibodies

To determine the binding sites of the mAbs, we have measured by ELISA their binding to a Clade B overlapping peptides library containing recombinant seventeen peptides derived from gp41 (Table 3). Binding of each individual mAb was also tested on gp140 from Clade C produced in CHO as positive control (Table 3). Cl1 recognized only a linear epitope located in the HR2 region (623-661) while cl2 and cl3 bound specifically to a conformational epitope formed by the HR1 region (541-592) and to the same fragment of the HR2 recognized by cl1. In addition, cl2 bound to the immunodominant region (592-623) (Fig. 1).

In an attempt to further identify the ability of the three mAbs to detect the spatial structure of the HR1/HR2 complex, we measured the antibody binding to the fusion structures including N36/C34 and four other complexes constructed in the laboratory HUG24H1[clade D]/HTXH2[clade B], HBR25H1[clade C]/HTH22H2[clade EA], HRW20H1[clade A]/HXH2[clade B], H896H1[clade B]/HUG37H2[clade A]) and the complex formed by mixing the two recognized peptides 47 53/47 67 (Table 3). Cl2 and Cl3 bound with a great efficiency to the complex 47 53/47 67 and to a reduced level with the other constructed complexes. No binding of the different mAbs was observed with the N36/C34.

It is probably due to the lack of three amino acid residues in the N36 sequence. And according to the cartography results, the C34 sequence was not involved in the C terminal region recognized region by cl2 and cl3. Cl1 recognized only a linear epitope located at the C-terminal, thus it was not able to recognize the previously constructed complex.

Cell-cell fusion inhibition

Interestingly, all three mAbs could inhibit HIV-1 Env-mediated membrane fusion of CHO-WT and Hela CD4 at 10-15 µg/ml. (Fig. 4). Cl 1 inhibited syncytia formation by 47%, cl2 by 70% and

c13 by 60% when syncytia were counted under microscope. T20 was used as a control in the same cell fusion system (146). The T20, which blocks the gp41-dependent virus-cell fusion, showed a complete inhibition of syncytium formation at 2.5 ug/ml. We observed that the three clones reduced the ability to form syncytia. These results showed an inhibitory activity of the three mAbs against HIV-1.

Blocking of HR1/HR2 complex formation

We have developed a convenient method for detecting the formation of the gp41 fusion complex for studying the inhibitory activity of mAbs. To evaluate the *in vitro* capacity of the three mAbs to interfere with the fusion complex formation, we have used a highly stable complex model composed of HR1 (clade D) and HR2 (clade B) available in the laboratory. This complex is well recognized in ELISA by the D5 mAb specific of the conformational complex.

We have determined that c11, 2 and 3 block specifically the HR1/HR2 complex formation with 55%, 74% and 79% of efficiency respectively (Fig. 5). These results suggest that the three mAbs bind to HR1 or HR2 protein and interfere with the association between the HR1 and HR2 regions. However, when the conformation specific NC-1 mAb was used for detecting this model, we found that c12 and c13 increased the recognition and the association between the two regions (data not shown).

DISCUSSION

HIV-1 envelope glycoprotein is the major target for humoral immune response in viral infection. MAbs directed against gp41 region may neutralize this virus in blocking the formation of the fusion complex with cells, thereby protecting cells from infection (14, 39, 40). In a recent study, two novel MAbs PG9 and PG16 were described against gp120 with marked cross-clade neutralization breadth and potency. The results suggest that these two antibodies recognize a conformational epitope in the gp120 that is dependent on glycosylation at specific variable loop N-linked sites demonstrating the importance of the conformational epitopes (12). The same group found that the broad serum neutralizing activity in about one third of patients was more efficiently adsorbed with recombinantly trimerized gp140 than with monomeric gp120, indicating the presence of neutralizing antibodies directed against quaternary gp120 epitopes that are somewhat better exposed on the YU2 gp140-folden trimer or directed against gp41(36).

The high degree of variation in gp120 sequence and glycosylation coupled with the highly conserved sequence of gp41 has long rendered gp41 an attractive target for inhibitors and antibodies with anti-HIV activity (28, 40). Entry inhibitors are a new class of drugs for the treatment of HIV infection. Enfuvirtide is the first compound of this family to be approved for clinical use (16). T20 is a synthetic peptide that mimics an HR2 fragment of gp41, blocking the formation of a six-helix bundle structure which is critical in the fusion process. Enfuvirtide is a good therapeutic option as rescue therapy in combination with other active antiretrovirals and works against different HIV-1 variants, including all group M subtypes and group O (26). The main mechanism of resistance to enfuvirtide depends of the selection of changes in a ten amino-acid domain between residues 36 to 45 in the HR1 region of gp41. Single and double mutations in this region have been shown to result in high level resistance to enfuvirtide (24, 30).

Gp41 is highly immunogenic and elicits antibodies in almost all HIV-1 infected individuals, with titers that can exceed 1:106. These titers are 25- to 625- fold higher than anti-gp120 titers(38). In addition, gp41 differs from gp120 in that all regions of the protein appear to be targeted by the human antibodies (29). The prefusiogenic conformation of gp41 is capable of stimulating a neutralizing antibody immune response and is therefore an attractive therapeutic target. Several

broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibodies which bind to gp41 have been characterized and include 4E10, 3D6, Z13, 5F3 and 2F5 (8).

The heptad repeat regions HR1 and HR2 of HIV-1 gp41 can be associated to form heterooligomers through helical coil-coil interactions that are believed to play a key role in virus-induced membrane fusion. The HR1/HR2 complex was proposed to be the core structure of the fusion-active conformation of gp41. The high degree of conservation in the gp41 N- and C-HR sequences among HIV-1 strains of different clades makes these structures potential targets for inhibition. Antibodies that are able to interact with the core of the putative fusion-active gp41 may be useful in further unveiling the mechanism of HIV-induced membrane fusion(8). Peptides representing these repeats are potent inhibitors of HIV infection (11). They appear to block virus entry by mimicking helices of the six-helix bundle and forming a peptide-gp41 complex, which interferes with the formation of the gp41 six helix bundle in a dominant negative manner. Earlier study concluded that six-helix bundles can form prior to membrane fusion and that the prehairpin fusion intermediates and can be accessible to antibodies (15).

The formation of the HR1-PID-HR2-TM viral structure was required because it is only transiently exposed during fusion of the virus with the host cell. Indeed, for this reason, antibodies targeting this region are not expected to be readily generated during natural infection, and no such naturally occurring antibodies have been identified to date.

To generate antibodies with predetermined specificity against the transiently exposing intermediate that corresponds to the six-helix bundle structure in order to mimic the correct folding of the glycoprotein in viral particles, it was necessary to construct a stable human cell line expressing HR1-PID-HR2-TM from a clade C primary strain at the cell membrane in a well defined conformational state.

The use of specific gp41 antibodies which recognize both linear and conformational epitopes has demonstrated the correct expression of the immunogen in the human cell line. This human cell line has been used to immunize Balb/C mice to generate hybridomas producing specific gp41 antibodies. From the high numbers of murine monoclonal antibodies produced against HR1-PID-HR2-TM, three monoclonal antibodies were able to efficiently neutralize LAI and BAL laboratory strains and several HIV-1 primary isolates. Neutralization activity for the 2F5, 4E10 was often observed at higher concentration than 50 µg/ml with an IC₅₀ by using classical neutralization

PBMC assay (2). We observed from our results that c12 neutralized at 12.5 $\mu\text{g/ml}$ mostly with virus clade B tropism CCR5 and CXCR4. we concluded that the conformational antibody is most crucial for the neutralizing activity.

Two mAbs (c12 and c13) have the capacity to recognize both the native envelope glycoprotein gp140 and a conformational epitope composed by a first peptide located in the N-terminal part of the gp41 and a second one located in the C-terminal part of gp41. The c11 antibody was only reactive with a linear epitope located in HR2 as previously described antibodies (2F5, 4E10). The three mAbs interfered with the gp41 conformational changes by blocking the formation of the fusion active gp41 six helix bundle as demonstrated by two different assay systems (cell-cell fusion test and ELISA test). The ability of others anti-gp41 specific MABs as 2F5 or 4E10 to block fusion was observed at concentration about 100 $\mu\text{g/ml}$ by co- culture the MOLT/CCR5 cells representing the chronically infected with the NL4-3 /BaL HIV isolates with CD4 T cells (23). In other study, four mAbs against HIV-1 gp41 were prepared in mice, the results showed that all four purified mAbs could inhibit HIV-1 Env-mediated membrane fusion (syncytium formation) by 40%-60% at 10 $\mu\text{g/mL}$, which implies potential inhibitory activities against HIV-1.

In this work, we have used conformational gp41 to induce new potent neutralizing antibody. By using a gp41-specific expressing human cell line, we have shown that we could generate in mice antibodies highly specific of the fusion complex. These antibodies have the capacity to strongly interfere with the complex formation and to inhibit very efficiently the HIV-1 infectious process. We have not yet studied the capacity of our antibodies to mediate ADCC against infected cells as reported before. However, we would like first to humanized our MABs in order to prevent HAMA immune responses both in monkeys and in humans. Such type of antibodies specific for the fusion complex could be used, alone or associated, as therapy to block the entry of HIV-1 after a recent viral exposition or to reduce after systemic administration the viral burden and massive CD4 depletion in HIV-1 reservoir as the intestine. MABs against gp41 fusion complex could also be used to provide protection against HIV challenge in passive transfer studies in macaques as described

before for 2F5, 4E10 (22, 39).The capacity of these antibodies to block the fusion process could be an attractive way to treat patients infected with T20 resistant strains.

It appears that the fusion complex epitope is strongly immunogenic and is able to elicit neutralizing antibody. Prophylactic vaccinal approaches should consider to use conformational fusion complex to induce local protective immunity.

Figure legends:

Figure 1: Schematic representation of the HIV-1 gp41 showing the (FP) fusion peptide, (HR1) heptad repeat region 1; (PID) immunodominant peptide; (HR2) heptad repeat region 2; (MPER) membrane proximal external region; (TM) transmembrane domain. The amino-acid residues and their position number are indicated in italics.

Figure 2:

- Figure 2A: HR1-PID-HR2-TM expressed at the HEK 293 cell surface was detected by immunofluorescence with human anti-gp41 3D6 (b), 2F5(c), 4E10 (d) and goat anti-human IgG antibody coupled with FITC, (e) the cells was directly detected with anti-myc FITC. Fig 2a represents the negative control.

- Figure 2B: Histogram generated by flow cytometry analysis shows the detection of the gp41 at the cell membrane surface of transfected HEK cells 293 using anti-gp41 antibodies Z13, 2F5, 5F3 and by anti-human FITC antibody. The percentage of stained cells is indicated beside each curve

- Figure 2C: Binding of the mouse conformation specific NC-1 Ab and antihuman-gp41 D5 to HEK 293-cells expressing the gp41 followed by anti-mouse or by anti-human FITC secondary antibody, respectively, in flow cytometry analysis. The upper right quadrants represents the percentage of the recognized cells by NC1 or D5.

The two dot plot graphs at the bottom represent the control for each labelled secondary antibodies

Figure 3: Intensity of fluorescence by flow cytometry of HEK 223 cells transfected with HR1-PID-HR2-TM with three produced monoclonal antibodies followed by anti- mouse secondary antibody coupled with FITC. The arrows indicate the position of each antibody showing the percentage of the stained cells.

Figure 4: Inhibition of the HIV-1Env mediated syncytium formation between Hela CD4 and HIV-1 HXB2 Env- transfected CHO cells (CHO-WT) by the three Mabs

Fusion inhibition with the three monoclonal antibodies is compared to the effect of T20.

Figure 5: Mechanism of action of the three monoclonal antibodies on fusion complex formation after mixing of HR2 (HTXH2 clade B) and HR1 (HUG24H1 clade D) proteins measured by ELISA using D5 mAb to identify the complexes.

The P-value was indicated.

BIBLIOGRAPHY

1. **Barbato, G., E. Bianchi, P. Ingallinella, W. H. Hurni, M. D. Miller, G. Ciliberto, R. Cortese, R. Bazzo, J. W. Shiver, and A. Pessi.** 2003. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J Mol Biol* **330**:1101-1115.
2. **Binley, J. M., T. Wrin, B. Korber, M. B. Zwick, M. Wang, C. Chappey, G. Stiegler, R. Kunert, S. Zolla-Pazner, H. Katinger, C. J. Petropoulos, and D. R. Burton.** 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* **78**:13232-13252.
3. **Brunel, F. M., M. B. Zwick, R. M. Cardoso, J. D. Nelson, I. A. Wilson, D. R. Burton, and P. E. Dawson.** 2006. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J Virol* **80**:1680-1687.
4. **Caffrey, M., M. Cai, J. Kaufman, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, D. G. Covell, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore.** 1998. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J* **17**:4572-4584.
5. **Cardoso, R. M., F. M. Brunel, S. Ferguson, M. Zwick, D. R. Burton, P. E. Dawson, and I. A. Wilson.** 2007. Structural basis of enhanced binding of extended and helically constrained peptide epitopes of the broadly neutralizing HIV-1 antibody 4E10. *J Mol Biol* **365**:1533-1544.
6. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
7. **Chen, C. H., M. L. Greenberg, D. P. Bolognesi, and T. J. Matthews.** 2000. Monoclonal antibodies that bind to the core of fusion-active glycoprotein 41. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:2037-2041.
8. **Chen, Y. H., A. Susanna, F. Steindl, H. Katinger, and M. P. Dierich.** 1994. HIV-1 gp41 shares a common immunologic determinant with normal human blood lymphocytes and monocytes. *AIDS* **8**:130-131.

9. **Colman, P. M., and M. C. Lawrence.** 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:309-319.
10. **de Rosny, E., R. Vassell, P. T. Wingfield, C. T. Wild, and C. D. Weiss.** 2001. Peptides corresponding to the heptad repeat motifs in the transmembrane protein (gp41) of human immunodeficiency virus type 1 elicit antibodies to receptor-activated conformations of the envelope glycoprotein. *J Virol* **75**:8859-8863.
11. **Doores, K. J., and D. R. Burton.** 2010 Variable loop glycan dependency of the broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies PG9 and PG16. *J Virol* **84**:10510-10521.
12. **Eckert, D. M., and P. S. Kim.** 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**:777-810.
13. **Forthal, D. N., and C. Moog.** 2009. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* **4**:388-393.
14. **Gauduin, M. C., P. W. Parren, R. Weir, C. F. Barbas, D. R. Burton, and R. A. Koup.** 1997. Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat Med* **3**:1389-1393.
15. **Golding, H., M. Zaitseva, E. de Rosny, L. R. King, J. Manischewitz, I. Sidorov, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, D. S. Dimitrov, and C. D. Weiss.** 2002. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol* **76**:6780-6790.
16. **Greenberg, M. L., and N. Cammack.** 2004. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* **54**:333-340.
17. **Hinz, A., G. Schoehn, H. Quendler, D. L. Hulsik, G. Stiegler, H. Katinger, M. S. Seaman, D. Montefiori, and W. Weissenhorn.** 2009. Characterization of a trimeric MPER containing HIV-1 gp41 antigen. *Virology* **390**:221-227.
18. **Kilgore, N. R., K. Salzwedel, M. Reddick, G. P. Allaway, and C. T. Wild.** 2003. Direct evidence that C-peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry bind to the gp41 N-helical domain in receptor-activated viral envelope. *J Virol* **77**:7669-7672.
19. **Ko, S. Y., C. Cheng, W. P. Kong, L. Wang, M. Kanekiyo, D. Einfeld, C. R. King, J. G. Gall, and G. J. Nabel.** 2009. Enhanced induction of intestinal cellular immunity by oral priming with enteric adenovirus 41 vectors. *J Virol* **83**:748-756.

20. **Law, M., R. M. Cardoso, I. A. Wilson, and D. R. Burton.** 2007. Antigenic and immunogenic study of membrane-proximal external region-grafted gp120 antigens by a DNA prime-protein boost immunization strategy. *J Virol* **81**:4272-4285.
21. **Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* **2**:1075-1082.
22. **Mascola, J. R., G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S. S. Frankel, D. L. Birx, and M. G. Lewis.** 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* **6**:207-210.
23. **Massanella, M., I. Puigdomenech, C. Cabrera, M. T. Fernandez-Figueras, A. Aucher, G. Gaibelet, D. Hudrisier, E. Garcia, M. Bofill, B. Clotet, and J. Blanco.** 2009. Antip41 antibodies fail to block early events of virological synapses but inhibit HIV spread between T cells. *AIDS* **23**:183-188.
24. **McGaughey, G. B., G. Barbato, E. Bianchi, R. M. Freidinger, V. M. Garsky, W. M. Hurni, J. G. Joyce, X. Liang, M. D. Miller, A. Pessi, J. W. Shiver, and M. J. Bogusky.** 2004. Progress towards the development of a HIV-1 gp41-directed vaccine. *Curr HIV Res* **2**:193-204.
25. **McGaughey, G. B., M. Citron, R. C. Danzeisen, R. M. Freidinger, V. M. Garsky, W. M. Hurni, J. G. Joyce, X. Liang, M. Miller, J. Shiver, and M. J. Bogusky.** 2003. HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry* **42**:3214-3223.
26. **Moyle, G.** 2003. Stopping HIV fusion with enfuvirtide: the first step to extracellular HAART. *J Antimicrob Chemother* **51**:213-217.
27. **Ofek, G., M. Tang, A. Sambor, H. Katinger, J. R. Mascola, R. Wyatt, and P. D. Kwong.** 2004. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* **78**:10724-10737.
28. **Pan, C., L. Cai, H. Lu, Z. Qi, and S. Jiang.** 2009. Combinations of the first and next generations of human immunodeficiency virus (HIV) fusion inhibitors exhibit a highly potent synergistic effect against enfuvirtide- sensitive and -resistant HIV type 1 strains. *J Virol* **83**:7862-7872.

29. **Pantophlet, R., and D. R. Burton.** 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol* **24**:739-769.
30. **Pietzsch, J., J. F. Scheid, H. Mouquet, M. S. Seaman, C. C. Broder, and M. C. Nussenzweig.** 2010 Anti-gp41 antibodies cloned from HIV-infected patients with broadly neutralizing serologic activity. *J Virol* **84**:5032-5042.
31. **Poveda, E., V. Briz, and V. Soriano.** 2005. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev* **7**:139-147.
32. **Qi, Z., C. Pan, H. Lu, Y. Shui, L. Li, X. Li, X. Xu, S. Liu, and S. Jiang.** 2010 A recombinant mimetics of the HIV-1 gp41 prehairpin fusion intermediate fused with human IgG Fc fragment elicits neutralizing antibody response in the vaccinated mice. *Biochem Biophys Res Commun* **398**:506-512.
33. **Ray, N., L. A. Blackburn, and R. W. Doms.** 2009. HR-2 mutations in human immunodeficiency virus type 1 gp41 restore fusion kinetics delayed by HR-1 mutations that cause clinical resistance to enfuvirtide. *J Virol* **83**:2989-2995.
34. **Sreepian, A., J. Permmongkol, W. Kantakamalakul, S. Siritantikorn, N. Tanlieng, and R. Sutthent.** 2009. HIV-1 neutralization by monoclonal antibody against conserved region 2 and patterns of epitope exposure on the surface of native viruses. *J Immune Based Ther Vaccines* **7**:5.
35. **Trebak, M., J. M. Chong, D. Herlyn, and D. W. Speicher.** 1999. Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology. *J Immunol Methods* **230**:59-70.
36. **Vincent, N., A. Kone, B. Chanut, F. Lucht, C. Genin, and E. Malvoisin.** 2008. Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* **22**:2075-2085.
37. **Walker, L. M., M. D. Simek, F. Priddy, J. S. Gach, D. Wagner, M. B. Zwick, S. K. Phogat, P. Poignard, and D. R. Burton.** 2010 A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog* **6**.

38. **Welch, B. D., A. P. VanDemark, A. Heroux, C. P. Hill, and M. S. Kay.** 2007. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16828-16833.
39. **Xu, J. Y., M. K. Gorny, T. Palker, S. Karwowska, and S. Zolla-Pazner.** 1991. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol* **65**:4832-4838.
40. **Xu, W., R. Hofmann-Lehmann, H. M. McClure, and R. M. Ruprecht.** 2002. Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV. *Vaccine* **20**:1956-1960.
41. **Zwick, M. B., A. F. Labrijn, M. Wang, C. Spenlehauer, E. O. Saphire, J. M. Binley, J. P. Moore, G. Stiegler, H. Katinger, D. R. Burton, and P. W. Parren.** 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**:10892-10905.

TABLE 1: Gp41 PCR primer sequences

Primer	Sequence
P1	5-GGA GGA AGT GGA GGA TGG AAT TCT AGT TGG AGT AAT AGA TCT CAA GAG GAT ATT TG -3
P2	5-GAG TTT TTG TTC GTC GAC CTG CAG TCA CTG CCT AAC TCT ATT CAC TAT AGA GAG CAC AGC-3
P3	5-GAG TTT TTG TTC GTC GAC CTG CAG TTT TAT ATA CCA CAG CCA ATT TGT TAT GCC AAA CCA AGT-3

Table 2: Neutralizing activities of the murine MAbs on laboratory strains and primary HIV-1 strains.

Strain (clade)	Concentration of the neutralizing mAbs		
	Clone 1	Clone 2	Clone 3
LAI (B) (CXCR4)	IC80 : 0.78 µg/ml	IC80 : 12.5µg/ml	IC80 : 1.5µg/ml
BAL (B) (CCR5)	IC80 : 12.5µg/ml	IC80 : 12.5µg/ml	IC80 : 25µg/ml
SF162 (B) (CXCR4)	IC50 : 100µg/ml	IC80 : 100µg/ml	IC80 : 100 µg/ml
QH0692 (B)	IC50 : 10 µg/ml	IC80 : 100µg/ml	IC50 : 100µg/ml
92US660 (B) (CCR5)	IC50 : 50µg/ml	IC50 : 25µg/ml	IC50 : 50µg/ml
92BR025 (C) (CCR5)	++++	++++	+++

This table shows the lowest concentration of the three purified mAbs to obtain neutralization at 80 % or 50 %. The + refer to the activity of the antibody in the supernatant of 92BR025 strain in which the antibody's concentration is unknown

Table 3: Epitope Mapping of the three monoclonal antibodies using the SHIV 89.6P env library

Gp41 Peptide		Optical density ^a		
		Clone 1	Clone 2	Clone 3
4753(HR1)	531-550	ND	0.754±0.038	0.447±0.0134
4754(HR1)	541-560	ND	0.454±0.0049	0.344±0.016
4755(HR1)	551-570	ND	ND	ND
4756(HR1)	561-580	ND	ND	ND
4757(HR1)	571-590	ND	ND	ND
4758(HR1)	581-600	ND	ND	ND
4759	591-610 PID	ND	0.249±0.0169	ND
4760	601-620	ND	ND	ND
4761	611-630	ND	ND	ND
4762(HR2)	621-640	ND	ND	ND
4763(HR2)	631-650	ND	ND	ND
4764(HR2)	641-660	ND	ND	ND
4765(HR2)	651-670	ND	ND	ND
4766(HR2)	661-680	ND	ND	ND
4767(HR2)	671-690	0.467±0.019	0.905±0.0247	0.679±0.0014
4768	681-700	ND	ND	ND
4769	691-710	ND	ND	ND
Gp140		ND	0.882±0.0014	0.94±0.0123
N36/C34	{ N36 (546-581)	0.31±0.012	ND	ND
	{ C34 (628-661)			

Complete set representing fragments of gp41 and the gp140 is in folded conformation. ^aData represent mean values ±SD of two determinations; ND: no detectable binding

Figure 1:

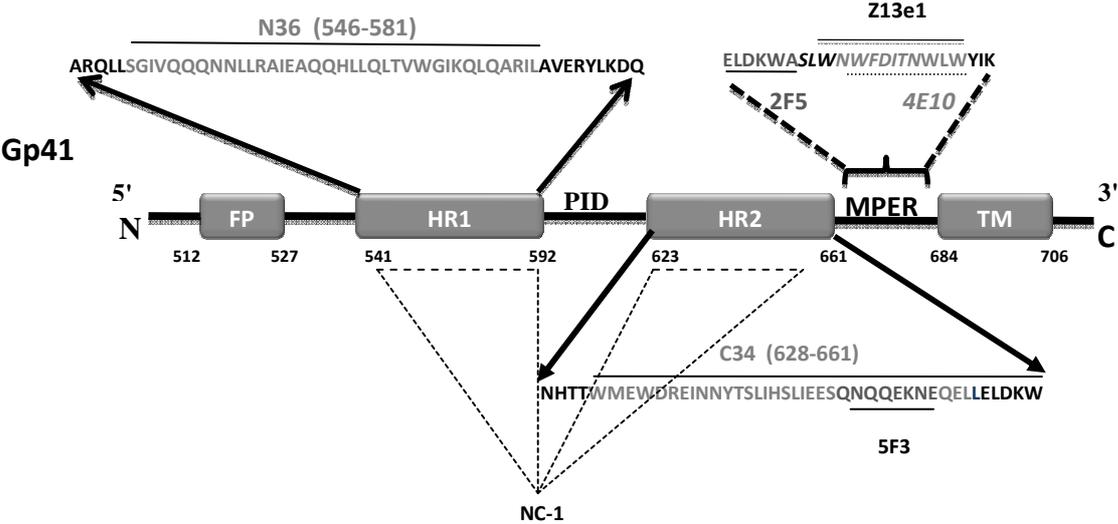
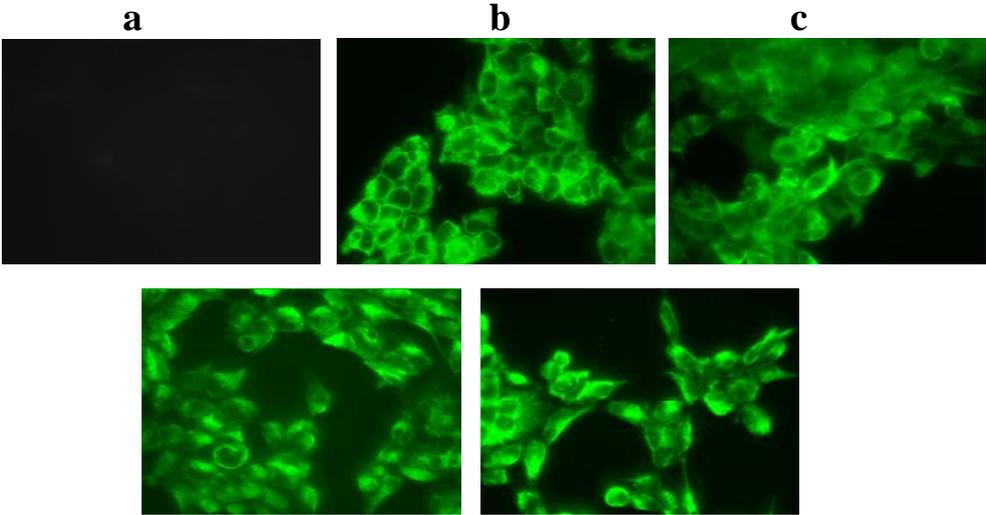
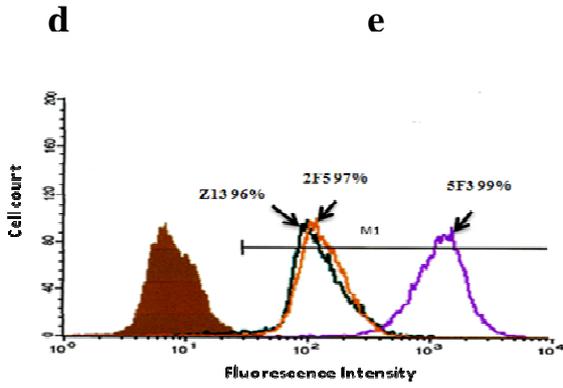


Figure 2

A



B



C

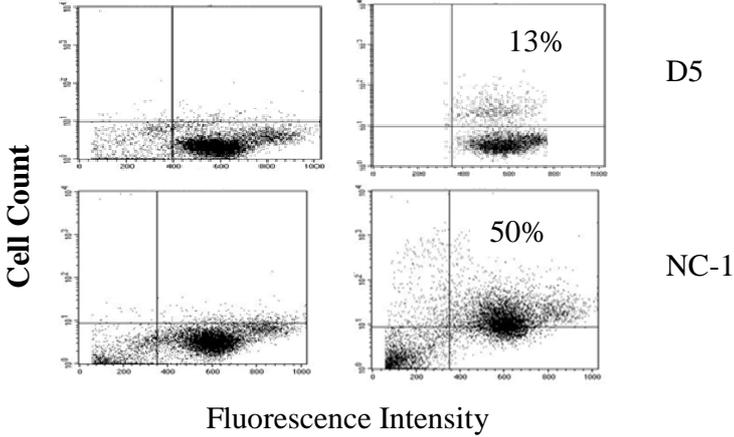


Figure 3:

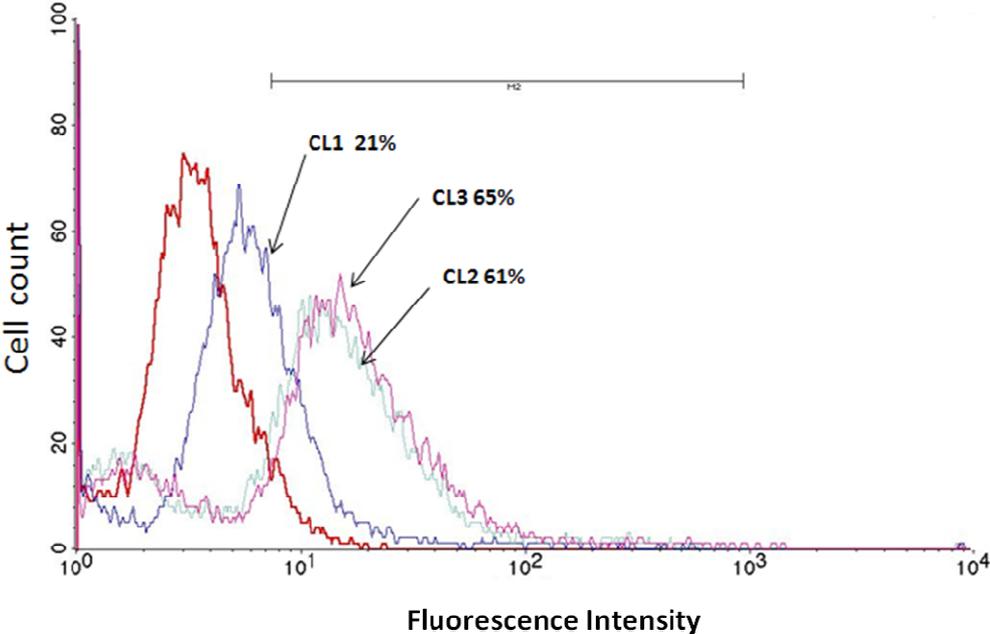


Figure 4:

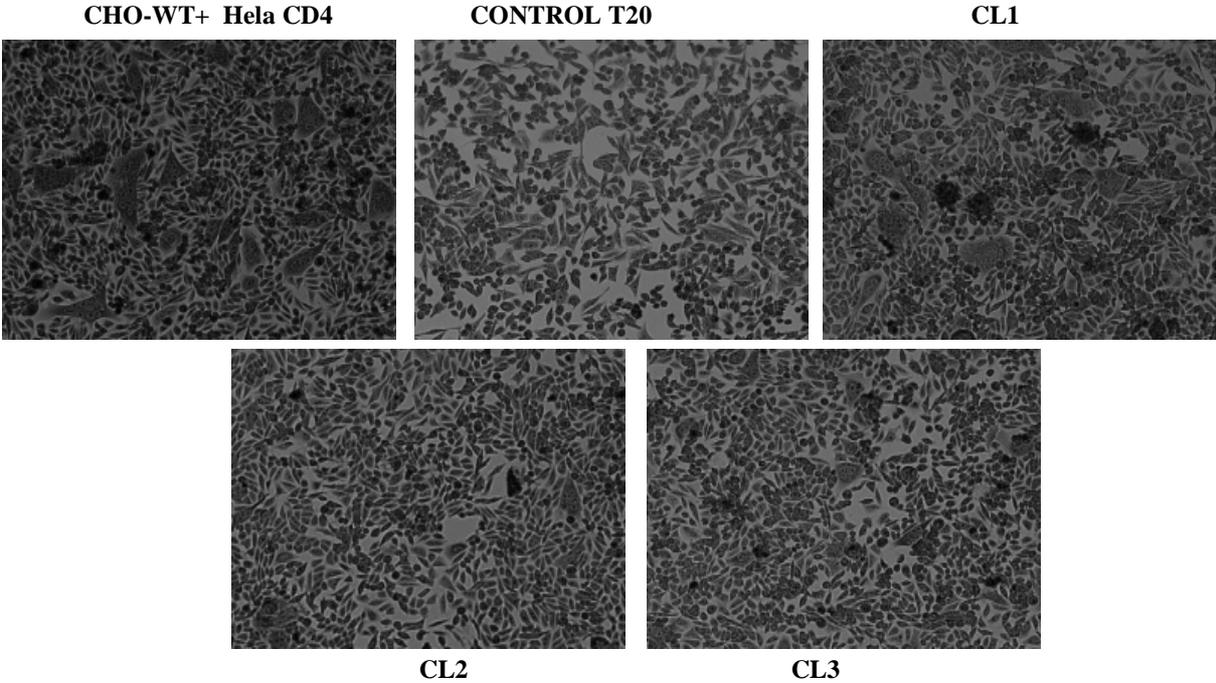
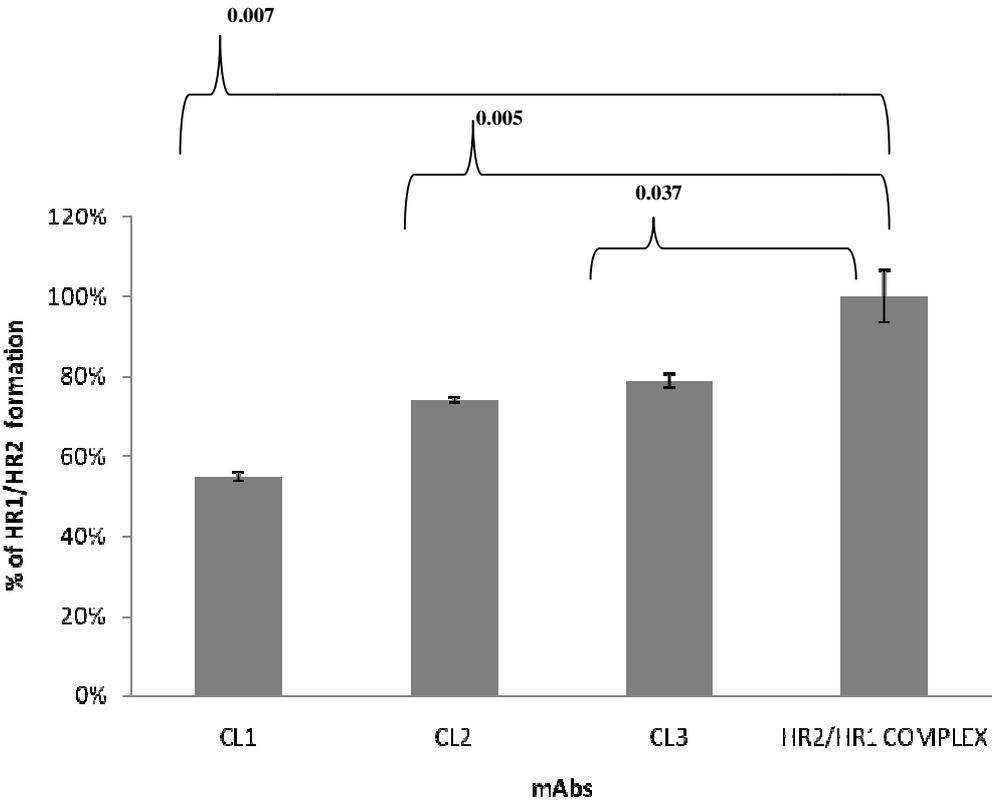


Figure 5:



DISCUSSION

Une fois que la fixation de la gp120 au récepteur CD4 a eu lieu, une série de changements conformationnels de la gp41 surviennent. Ces modifications consistent en une association de la région NHR de trois sous-unités de la gp41 pour former une structure à trois brins « coiled coil », en association antiparallèle avec trois sous-unités de la région CHR pour construire le complexe de six hélices. Ce complexe entraîne la fusion de la membrane virale et de la membrane de la cellule-cible.

Les anticorps dirigés contre la gp41 comme 2F5, Z13, 4E10 sont plus neutralisants que ceux ciblant la gp120 comme 2G12, b12 en raison des fortes variabilité et glycosylation de la gp120. Les trois anticorps monoclonaux ont été criblés précédemment chez des patients VIH séropositifs (55, 83-86). Le 2F5 reconnaît la séquence conservée ELDKWA, tandis que le 4E10 et le Z13 reconnaissent la séquence NWF (D/N) (87-88).

Pour notre travail, l'élaboration d'une lignée exprimant HR1-PID-HR2-TM était nécessaire parce que cette structure est exposée de façon transitoire lors de la fusion du virus avec la cellule-cible. On sait qu'une grande partie de la gp41 est susceptible d'être masquée par la gp120, et donc inaccessible au système immunitaire (24). Pour cette raison, aucun anticorps dirigé contre cette structure n'apparaît lors de l'infection naturelle et aucun de ces anticorps n'était identifié à ce jour. Une étude a montré que les peptides synthétiques N36/C34 en forme de superhélice pouvaient inhiber le processus de fusion. Le complexe HR1/HR2 entier semble être un immunogène très particulier qui est capable d'induire des anticorps conformationnels mais pas neutralisants. Le NC-1 a été obtenu en injectant les peptides N36 et C34. L'anticorps monoclonal obtenu reconnaissait la forme fusiogène de la gp41 mais il n'avait pas d'activité neutralisante contre le VIH (93). L'incapacité d'induire des anticorps neutralisants à large spectre avec ce type d'immunisation est due à l'utilisation de polypeptides non glycosylés et non conformationnels en tant qu'immunogènes. Cependant, l'existence d'anticorps neutralisants dirigés contre le complexe HR1/HR2 dans les sérums de sujets séropositifs a été observée dans plusieurs études. Les régions HR1/HR2 de la gp41 sont bien conservées parmi les isolats viraux du VIH et ceci lui permet de préserver leur capacité à former un complexe.

La structure HR1-PID-HR2-TM_{viral} et la structure HR1-PID-HR2-TM_{vecteur} ont été amplifiées spécifiquement en utilisant le plasmide BR025 par PCR. Les deux structures ont été ensuite clonées séparément dans un vecteur d'expression mammifère. L'insertion des deux structures dans leur vecteur p-display a été vérifiée par digestion enzymatique et par séquençage.

Les cellules HEK293 (cellules embryonnaires de rein) ont été les premières cellules humaines issues d'une transfection par un adénovirus. La cytométrie et l'immunofluorescence ont permis de visualiser les cellules exprimant la gp41 et donc de valider la transfection stable au niveau des cellules HEK 293.

Ensuite, nous avons immunisé des souris avec la lignée 293-gp41TM afin de produire des anticorps monoclonaux. Nous avons observé que parmi les 500 surnageants d'hybridomes testés, 40 clones reconnaissent spécifiquement la gp41 seule. L'effet neutralisant de ces 40 surnageants a été étudié sur le modèle LAI/SupT1. Trois anticorps étaient capables d'inhiber efficacement l'infection.

Après purification et quantification, nous avons observé que les trois anticorps possèdent la capacité de neutraliser de façon importante les souches de laboratoire LAI et BAL et des isolats primaires de clade B et C. Les trois anticorps monoclonaux générés dans cette étude (C11, C12 et C13) sont neutralisants à faible concentration contre la souche LAI (CXCR4-tropique) (IC80 CL1=0,78µg/ml, CL2=12,5µg/ml, CL3=1,5 µg/ml). Également, les trois anticorps sont neutralisants sur la souche BAL (CCR5-tropique) (IC80 pour CL1=12,5µg/ml, CL2=12,5µg/ml, CL3=25 µg/ml). L'activité neutralisante de ces anticorps a été testée sur différents isolats primaires de clade B et C (CXCR4 ou CCR5 tropiques). Nos résultats montrent que les anticorps c12 et c13 neutralisent aussi efficacement les trois souches de clade B que la souche de clade C (IC80= 100µg/ml). Cependant, l'effet de ces anticorps sur les souches de clade C demande une exploration plus complète sur différents isolats. Nous souhaiterions également tester l'activité de ces anticorps sur d'autres clades (A, E et F par exemple).

La cytométrie en flux a servi aussi à confirmer la spécificité des anticorps monoclonaux produits. L'épitope de ces anticorps a été défini par ELISA à l'aide d'une librairie de peptides synthétiques couvrant l'enveloppe et de la protéine gp140 produite en cellules CHO.

Nous avons observé que deux de nos trois anticorps reconnaissent des épitopes se situant à la fois à l'extrémité N-terminale de la gp41 et à l'extrémité du domaine C-terminal de la gp41 mais reconnaissent également la protéine gp41 conformationnelle. Ceci signifie que deux anticorps reconnaissent spécifiquement le complexe de fusion HR1/HR2. Le troisième anticorps reconnaît exclusivement le domaine C-terminal de la gp41.

Il serait intéressant de mesurer l'affinité de ces anticorps par SPR (Surface Plasmon Resonance) à l'aide d'un Biacore afin de mesurer l'affinité de ces anticorps contre le complexe de fusion ainsi que contre la gp41 dans sa configuration conformationnelle. Nous envisageons de préparer des membranes plasmiques de la lignée 293-gp41tm afin d'intégrer ces membranes dans un support hydrophobe Biacore et ainsi pouvoir mesurer l'avidité voir l'affinité de chacun des deux anticorps conformationnels. En parallèle, nous testerons l'affinité de ces anticorps sur différents complexes HR1/HR2.

L'étude de l'activité ADCC de nos anticorps serait également très intéressante dans un modèle d'infection VIH-1 *in vitro*. En effet, il a clairement été démontré que la possibilité de générer des anticorps neutralisants ayant la capacité de générer une réponse de type ADCC pouvait être un avantage pour le traitement de patients VIH-1 (6, 47)

L'activité neutralisante de ces anticorps a ensuite été corrélée avec leur activité fonctionnelle *in vitro*. La capacité des anticorps à bloquer la fusion membranaire a été mesurée dans un premier temps. Pour cela, nous avons utilisé le système de fusion cellulaire CHO-WT et Hela-CD4. Nous avons constaté une réduction significative de l'apparition de syncytia en présence des trois anticorps. Une inhibition de la fusion membranaire supérieure à 60% a été observée avec les anticorps spécifiques du complexe de fusion cl2 et cl3 à 12,5µg/ml et 7,5µg/ml, respectivement.

Dans une étude publiée précédemment, quatre anticorps monoclonaux dirigés contre la gp41 ont été générés chez la souris. Les quatre anticorps monoclonaux pouvaient se lier à une gp41 recombinante soluble et reconnaître la glycoprotéine d'enveloppe gp160. Les résultats ont montré que les quatre anticorps monoclonaux pourraient inhiber la fusion membranaire générée par Env (étudiée par la formation de syncytia) de 40%-60% à 10 µg/mL, ce qui implique une activité

potentiellement inhibitrice contre le VIH-1 mais ces anticorps n'ont pas montré d'activité neutralisante (52).

En parallèle, nous avons étudié si ces anticorps spécifiques du complexe de fusion étaient également capables de bloquer la formation de ce complexe *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé un complexe de fusion formé à partir de protéines recombinantes HR1 et HR2 produites dans *E. coli*. Dans ce test, nous avons pu montrer que les trois anticorps inhibaient très efficacement la formation du complexe de fusion en empêchant l'interaction entre les deux domaines, NHR et CHR. L'anticorps c11 spécifique du domaine HR2 semble inhiber la formation du complexe de fusion de façon plus efficace (45% d'inhibition à 15µg/ml) que les deux autres anticorps ciblant le complexe de fusion préformé.

Dans une autre étude, des IgG sériques ont été générées chez des souris immunisées par des peptides représentant le complexe de fusion. Ces anticorps avaient un effet neutralisant significatif (IC₅₀ = 120 nM) et inhibaient la formation de complexes en utilisant un test ELISA (105).

Les études précédentes démontrent l'impossibilité d'induire naturellement des anticorps neutralisants du fait de l'exposition structurale incorrecte de l'antigène. L'originalité et la nouveauté de cette étude est d'avoir optimiser l'expression conformationnelle de la gp41 en utilisant comme immunogène une lignée cellulaire exprimant la gp41 dans sa conformation originale. Nous avons pu montrer que l'utilisation de cette lignée permettait de générer des anticorps hautement efficaces dans leur capacité à neutraliser l'infection de souches de laboratoire et d'isolats primaires de clades différents (B et C) et de tropisme différent (CXCR4 et CCR5). L'activité neutralisante de ces anticorps a pu être corrélée avec leur capacité à interférer dans le processus de formation du complexe de fusion et donc dans la fusion membranaire entre la particule virale et sa cellule-cible.

La lignée 293-gp41TM s'avère être un outil particulièrement intéressant pour cribler des anticorps dirigés contre une gp41 conformationnelle. Nous avons également mis en place un test *in vitro* permettant de mesurer la capacité d'anticorps anti-gp41 à bloquer la formation du complexe de

fusion. Ce type de test pourrait notamment être utilisé pour mesurer l'efficacité de stratégies vaccinales chez des patients ou des sujets volontaires sains.

Ces anticorps pourraient être utilisés dans des approches de sérothérapie/immunothérapie passive afin de prévenir une transmission virale. En effet, les anticorps neutralisants administrés passivement, ont entraîné une protection lors d'une injection de SHIV dans certains modèles de singes. Les anticorps administrés par voie intraveineuse peuvent protéger le macaque contre une injection de SHIV (HIV/SIV) par voie intraveineuse et muqueuse. Par contre, l'administration en topique de ces anticorps ne peut protéger le macaque que contre une contamination vaginale (63, 74, 115) Le modèle de SHIV a été développé afin de mimer l'exposition de la muqueuse pendant la transmission du VIH au cours de la grossesse (4). Il a été montré que les deux anticorps monoclonaux 2F5 et 4E10 confèrent une protection complète contre le SHIV chez le macaque. Chaque anticorps a été administré par voie intraveineuse à des groupes de six mâles macaques rhésus 1 jour avant et 1 jour après l'injection intrarectale du SHIV(BAL). Dans ces groupes, cinq des six animaux ont montré une protection complète, et pour un macaque dans chaque groupe, une baisse de la réplication virale a été observée. Cette étude confirme le potentiel de protection des anticorps 2F5 et 4E10 (63).

La triple combinaison des anticorps F105, 2G12, 2F5 a été administrée à quatre femelles macaques enceintes qui ont reçu une injection intraveineuse de SHIV_{-vpu}. Celles-ci ont montré une protection contre le virus avant l'accouchement. Les nouveau-nés ont reçu oralement la même souche SHIV_{-vpu}. Après six mois, aucune infection n'a été observée. Cette étude a démontré que les trois anticorps monoclonaux sont essentiels pour obtenir une protection (4, 114). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe en utilisant le virus SHIV_{89.96PD} (45). Dans le travail de Mascola, les anticorps monoclonaux 2G12 et 2F5 ont aussi été injectés chez le macaque par injection intraveineuse (84). Le 2G12 administré seul ou en association avec le 2F5 ne confère qu'une protection partielle (8 macaques sur 14) après injection par voie vaginale (virus SHIV X4 tropique). L'administration intravaginale chez le macaque est l'un des modèles les plus efficaces pour effectuer des infections naturelles par le VIH, car il permet la transmission hétérosexuelle du SHIV qui est le mode d'infection le plus fréquent à travers le monde. En outre, la muqueuse vaginale intacte représente une barrière très efficace contre l'infection puisqu'une dose de

SIVmac251 100 - à 1000 fois plus importante est nécessaire pour obtenir une infection par voie vaginale que par injection intraveineuse du virus (90, 130).

L'étude de Mascola *et al* avait néanmoins un facteur limitant : le virus utilisé avait un tropisme dual R5-X4 avec une préférence pour le corécepteur X4 alors que les virus isolés lors d'une infection aiguë, ont un tropisme R5. De plus, les virus R5 sont généralement impliqués dans la transmission mère-enfant et l'absence d'expression de R5 est corrélée avec une forte protection contre l'infection par le VIH (66).

L'ensemble de ces études démontre l'efficacité potentielle que peut avoir l'administration par voie systémique d'anticorps neutralisants pour prévenir l'infection. L'administration de ces anticorps pourrait également limiter la réplication virale chez des individus infectés au stade de primo-infection. Ils pourraient notamment limiter l'accumulation du virus dans des réservoirs tels que l'intestin, la moelle osseuse ou le cerveau. Cette étude nous confirme le potentiel de protection des anticorps 2F5 et 4E10. L'utilisation locale d'anticorps neutralisants capables de bloquer l'infection muqueuse du VIH-1 pourrait aussi conférer une protection efficace contre une infection virale (127).

Pour la suite de ce travail, nous envisageons de tester la capacité des anticorps à bloquer la transmission d'un virus SHIV chez le macaque. Ces anticorps seront comparés aux anticorps de référence tels que l'anticorps 2F5 ou 4E10. Afin de faciliter l'application vaginale ou rectale de ces anticorps, ils seront formulés dans un gel afin d'en améliorer la persistance locale. Pour cela, nous devons produire de grandes quantités d'anticorps afin de pouvoir les tester *in vivo*. Une production à grande échelle de ces anticorps est actuellement en cours dans le système de flasques Integra. En parallèle, il apparaît probable que pour pouvoir tester ces anticorps dans des protocoles de sérothérapie passive, nous devons procéder à leur humanisation partielle ou complète. Dans ce but, nous allons cloner les régions VH et VL des 3 hybridomes producteurs dans des plasmides d'expression d'immunoglobulines. Nous testerons l'efficacité de ces 3 anticorps dans un contexte humanisé en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 et IgA2. En fonction de l'isotype de l'anticorps, nous espérons ainsi améliorer l'efficacité *in vivo* de nos anticorps en facilitant notamment leur capacité à induire une réponse de type ADCC.

Plusieurs stratégies principales d'ingénierie moléculaire peuvent permettre l'humanisation de nos anticorps.

– la construction d’anticorps chimériques (93), qui consiste à isoler l’ADN codant pour le domaine VH et le domaine VL d’un Ac monoclonal murin et à le lier à l’ADN codant les domaines constants H et L d’une immunoglobuline humaine. Cela permet de produire un anticorps hybride dont la partie constante est humaine : il s’agit en général de la région constante des IgG1 humaines ($\gamma 1$) et de la région constante κ (C κ) humaine. De tels anticorps sont humanisés à 75% et moins immunogènes que les anticorps de souris, car les épitopes immunodominants inter-espèces sont principalement localisés dans les domaines CH2 et CH3. Dans la plupart des cas, la spécificité et l’affinité des anticorps chimériques restent identiques à celles des anticorps murins parentaux. De légères modifications de la spécificité fine ont cependant été parfois observées, suggérant une influence des domaines constants sur la topologie des domaines variables. Cinq anticorps chimériques sont actuellement sur le marché (Reopro, Rituxan, Simulect, Remicade et Erbitux) ;

– la construction d’anticorps humanisés par greffe de régions hypervariables d’Ac monoclonaux de souris sur des régions structurales (FR) VH et VL humaines (106). La substitution des régions hypervariables d’Ac monoclonaux murins aux régions hypervariables de domaines VH et VL humains permet d’obtenir des anticorps humanisés, a priori peu immunogènes chez l’homme, car seules les régions hypervariables ont une origine murine. La difficulté de cette approche réside dans le choix des domaines VH et VL humains sur lesquels ces régions hypervariables vont s’insérer. Il est à noter que certains acides aminés situés en dehors des régions hypervariables jouent un rôle essentiel dans la conformation de l’anticorps. Certains changements de résidus de la région structurale peuvent ainsi modifier considérablement l’affinité de l’anticorps humanisé obtenu. Des expériences de modélisation et de comparaison de séquences des différents domaines VH et VL humains germinaux avec ceux des domaines VH et VL de l’anticorps parental murin peuvent déterminer le choix des domaines VH et VL humains sur lesquels s’effectue la substitution des CDRs. Par mutagenèse dirigée, on peut convertir un profil murin en un profil humain à l’aide d’un nombre restreint de substitutions d’acides aminés, sans modifier les capacités de liaison à l’antigène. Cette technique (variable domain resurfacing) a été utilisée pour humaniser différents anticorps monoclonaux (113). Sept anticorps humanisés sont actuellement sur le marché (Zenapax, Herceptine, Mylotarg, Synagis, Campath, Xolair et Avastin).

– l’obtention de souris transgéniques contenant une grande partie des gènes codant les chaînes lourdes et légères humaines (139). Cette approche consiste à remplacer les loci des gènes

d'immunoglobulines (Ig) de souris par les loci équivalents humains en utilisant des fragments d'ADN génomique humain, contenus dans des Yeast Artificial Chromosomes (YACs). Des souris dont une grande partie des loci IgH et Igk avait été inactivée (moIgK.O.) et des souris transgéniques contenant une partie des loci d'Ig humaines (huIgTg) ont été générées et croisées. Les souris issues de ce croisement [huIgTg × moIgK.O.] produisent des anticorps humains de type IgM, ou IgG lors de réponses secondaires, démontrant que les fragments introduits permettent l'expression des chaînes lourdes et légères humaines, ainsi que la commutation de classe. De plus, l'analyse des Ac monoclonaux obtenus a montré que des mutations somatiques affectaient les régions variables lors de la réponse secondaire, indiquant l'existence d'une maturation de la réponse anticorps. Ces souris permettent ainsi de générer des Ac monoclonaux humains de haute affinité contre n'importe quel antigène (60).

Le T20 est un peptide synthétique analogue de la région HR2. Son utilisation clinique est limitée en raison de l'émergence rapide de virus résistants chez les patients traités. Plusieurs études montrent que des combinaisons de T20 avec d'autres analogues structuraux de la gp41 comme les molécules T1249 et / ou T1144 sont plus efficaces que le T20 seul sur des souches T20 résistantes en améliorant notamment l'inhibition du processus de fusion (103). Nous envisageons de tester la capacité de nos anticorps à neutraliser des souches T20 résistantes. De plus, nous avons montré que les anticorps c12 et c3 ciblent spécifiquement le complexe de fusion au niveau d'épitopes différents du site de fixation de la molécule T20. Nous souhaiterions assez rapidement évaluer l'efficacité de combinaisons T20/anticorps sur des souches très difficiles à neutraliser *in vitro*. La capacité de ces combinaisons à neutraliser de nombreuses souches différentes sera également mesurée afin de compléter l'effet cross-clade de nos anticorps.

Les travaux récents publiés par l'équipe de M.Bomsel laissent envisager un grand intérêt de la gp41 dans des stratégies vaccinales notamment dans sa capacité à induire des réponses muqueuses neutralisantes. Une approche séduisante serait d'évaluer l'immunogénicité d'un vaccin nanoparticulaire ou de types liposome/virosome portant à sa surface le complexe de fusion HR1/HR2. En parallèle, nous souhaiterions évaluer l'immunogénicité d'un vaccin cellulaire inactivé basé sur la lignée 293-gp41TM.

ANNEXE

Les techniques mises au point

Le processus de fusion membranaire est une étape clef du cycle viral du VIH qui rend la gp41 une cible crucial et intéressante pour générer des anticorps monoclonaux spécifiques.

1. La transfection des cellules

Des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) ont été transfectées avec les deux plasmides séparément p-display/HR1-PID-HR2-TM_{viral} et p-display/HR1-PID-HR2-TM_{vecteur} obtenus par clonage. Le plasmide pSVIII 92BR025.9 contenant la séquence complète de la protéine d'enveloppe du VIH-1 a été utilisé comme matrice. Grâce à une transfection au calcium, Graham *et al* ont transfecté des HEK en les exposant à des fragments d'ADN d'adénovirus de type 5 (91). Ces cellules présentent un phénotype typique de cellules adéno-transformées avec en particulier la perte de l'inhibition de contact et la pousse en îlots. Elles ont les mêmes caractéristiques morphologiques que les cellules épithéliales avec cependant une assez grande variation dans la taille. Dans certains cas, les noyaux des cellules semblent gonflés et des hétérokaryons sont fréquents (91).

L'agent de sélection, la Généticine (G418), a été rajouté au milieu de culture deux jours seulement après la transfection. Ceci a permis de sélectionner dans un premier temps les cellules qui possèdent le plasmide dans leur cytoplasme puis dans un deuxième temps, les cellules qui ont intégré le plasmide dans leur génome. Tous les deux jours, les cellules mortes non résistantes à la Généticine, donc ne comportant pas le vecteur plasmidique, sont éliminées et le milieu de culture est remplacé par du milieu neuf contenant de la Généticine.

Les cellules ont été transfectées avec différentes concentrations du plasmide. L'efficacité de transfection a été mesurée par l'intensité de fluorescence. Nous avons utilisé la cytométrie en flux dans un premier temps pour valider la transfection. La sélection clonale a ensuite été effectuée.

Elle consiste à ensemer une cellule par puits dans une plaque de 96 puits. Après avoir ensemer la plaque, les puits où se trouve seulement un clone par puits sont sélectionnés. Les puits où il n'y a pas de cellules ou les puits où se trouvent plusieurs clones sont éliminés. Les clones sont ainsi réensemés pour permettre leur prolifération. Lorsqu'une population cellulaire, provenant de la prolifération d'une seule cellule, arrive à confluence, l'expression de la gp41 est contrôlée pour vérifier que les cellules HEK293 ont bien été transfectées de manière stable. Ainsi, deux lignées différentes exprimant soit la structure p-display/HR1-PID-HR2-TM_{viral} ou la structure p-display/HR1-PID-HR2-TM_{vecteur} de manière stable ont été obtenues.

Pour les cellules transfectées, nous avons observé une forte expression membranaire et intracellulaire de la gp41, donc la fonctionnalité de la lignée a été confirmée. Les anticorps utilisés pour valider la lignée sont tous les anticorps humains décrits dirigés contre la gp41 comme le 2F5, le 3D6, le 4E10, le Z13. Pour vérifier la conformation et la glycosylation de la lignée, nous avons utilisé un anticorps, le NC1, qui a été obtenu à partir de souris immunisées par le polypeptide N36/C34. La reconnaissance par NC1 de la lignée nous a permis de prouver la bonne conformation de la gp41.

2. La production des anticorps monoclonaux

Nous avons immunisé des souris avec la lignée afin de produire des anticorps monoclonaux en appliquant la technique de fusion.

La technique de fusion a été mise au point par George Köhler and César Milstein en 1975. Dans cette technique des cellules spléniques provenant de la souris immunisée par la lignée gp41 sont fusionnées avec des cellules de myélomes comme SP2/0 (tumeur de la moelle osseuse) pour produire des hybrides cellulaires ou hybridomes.

La fusion est facilitée en utilisant le polyéthylène glycol (PEG). Les cellules de myélome vont apporter la possibilité de pousser in vitro et vont rendre les hybridomes immortels tandis que les cellules spléniques vont apporter la capacité de synthèse d'immunoglobulines.

Le principe de cette technique est que les cellules de myélomes sont préalablement sélectionnées pour leurs déficiences en deux enzymes : la HGPRT (hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase) ou la TK (Thymidine Kinase).

En effet, les cellules eucaryotes ont deux voies pour synthétiser les nucléotides : soit la voie de néo-synthèse (de novo) à partir de sucres et acides aminés qui va être bloquée par une substance telle que l'azasérine soit la voie alterne à partir de nucléosides. L'HPRT et la TK assurent une étape essentielle de la voie alterne. Donc sur un milieu particulier nommé HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidin), seules les cellules fusionnées pourront survivre. Ce milieu HAT sera donc le milieu de sélection positive des cellules. Ensuite, la première sélection a été faite afin d'isoler les hybrides cellulaires contenant les anticorps. Les hybridomes désirés ont été sélectionnés par leur capacité à reconnaître la gp41.

Les anticorps capables d'inhiber efficacement l'infection ont été mis en production haute densité. La haute densité est un dispositif de culture permettant d'obtenir de fort rendement de cellules et de production d'anticorps. Il se compose de deux compartiments : un compartiment « milieu nutritif », un compartiment de production cellulaire et deux membranes. Une membrane en silicone à la base du compartiment cellulaire de production permettant d'assurer un transfert de gaz constituant le compartiment de cellule de base. Cette membrane offre une réserve d'oxygène optimale et le contrôle des concentrations de dioxyde de carbone. Une deuxième membrane semi-perméable de 10KDa entre les deux compartiments permettant une diffusion continue d'éléments nutritifs vers les cellules avec une suppression des déchets métaboliques. L'accessibilité directe de chaque compartiment permet de fournir les cellules en croissance avec le milieu frais du compartiment « milieu nutritif » sans interférer avec la culture des cellules et la production d'anticorps dans le compartiment cellulaire. Ils ont été purifiés par HPLC.

Une fois les hybridomes positifs sélectionnés, les surnageants positifs contenant les anticorps ont été récupérés afin de tester leur capacité neutralisante.

3. Le test de neutralisation

A partir des anticorps bien quantifiés et purifiés, nous avons réalisé le test de neutralisation sur le modèle LAI/ SupT1 et sur les isolats primaires du virus.

L'effet neutralisant de ces anticorps a été validé contre différents isolats primaires dans le cadre du réseau NeuNet grâce à une collaboration avec le Dr C. Moog (Institut de Virologie, Strasbourg).

La cytométrie en flux a servi aussi à confirmer la spécificité des anticorps monoclonaux produits.

Ensuite, il était nécessaire de caractériser les épitopes des anticorps produits. Les anticorps ont été cartographiés en utilisant des peptides de la protéine gp140 produite par des cellules eucaryotes qui représente la forme conformationnelle, à l'aide d'un test ELISA afin de situer les épitopes reconnus par les anticorps.

Les peptides utilisés étaient des structures linéaires chevauchantes couvrant la région gp41.

Le potentiel inhibiteur de ces anticorps a ensuite été évalué dans deux tests différents :

- Un test de fusion cellulaire entre les cellules CHO-wt qui expriment les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 LAI (virus à tropisme X4) avec les cellules Hela/CD4 qui expriment le récepteur CD4.

L'activité antivirale des anticorps a été évaluée pour leur capacité à bloquer la fusion membranaire médiée par CHO-WT et Hela-CD4. Dans ce test les cellules Hela-CD4 sont co-cultivées avec les cellules CHO-WT dans une plaque 96 puits en présence de différentes concentrations de chaque anticorps. Le T20 a été utilisé en parallèle comme contrôle négatif pour l'inhibition totale de la fusion cellulaire. Après 20 heures de culture à 37°C, le nombre de syncytia a été observé en microscope.

- Un test ELISA pour étudier si les anticorps produits inhibaient la formation de complexes et par conséquent bloquaient l'entrée du virus, il était nécessaire de créer un système où le complexe se forme. Nous avons utilisé des plaques ELISA adsorbées au nickel. La protéine HR2 qui porte une queue polyhistidine va permettre la fixation de la protéine, grâce à l'affinité qu'a l'histidine avec le nickel adsorbée sur les plaques.

Des plaques Ni-NTA ont été coatées avec des protéines HR2, les protéines HR1 complémentaires ont été rajoutées pour former le complexe HR1/HR2 qui est ensuite détecté par l'anticorps monoclonal D5. Ce complexe a servi de contrôle positif. Les anticorps monoclonaux sont incubés

avec le HR1 à 37°C pendant une 45 min. Ce mélange est rajouté dans la plaque. Ensuite, la formation de complexes en présence des anticorps est détectée par l'anticorps monoclonal D5. A la fin, les puits sont révélés par l'anticorps anti-IgG humain couplé à la peroxydase HRP. Le substrat de la peroxydase est rajouté. Cette technique a été mise au point au sein du GIMAP.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Amara, A., S. L. Gall, O. Schwartz, J. Salamero, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggiolini, J. L. Virelizier, and F. Arenzana-Seisdedos.** 1997. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* **186**:139-146.
2. **Armand-Ugon, M., A. Gutierrez, B. Clotet, and J. A. Este.** 2003. HIV-1 resistance to the gp41-dependent fusion inhibitor C-34. *Antiviral Res* **59**:137-142.
3. **Autran, B., D. Costagliola, R. Murphy, and C. Katlama.** 2004. Evaluating therapeutic vaccines in patients infected with HIV. *Expert Rev Vaccines* **3**:S169-177.
4. **Baba, T. W., V. Liska, R. Hofmann-Lehmann, J. Vlasak, W. Xu, S. Ayehunie, L. A. Cavacini, M. R. Posner, H. Katinger, G. Stiegler, B. J. Bernacky, T. A. Rizvi, R. Schmidt, L. R. Hill, M. E. Keeling, Y. Lu, J. E. Wright, T. C. Chou, and R. M. Ruprecht.** 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**:200-206.
5. **Banapour, B., K. Rosenthal, L. Rabin, V. Sharma, L. Young, J. Fernandez, E. Engleman, M. McGrath, G. Reyes, and J. Lifson.** 1987. Characterization and epitope mapping of a human monoclonal antibody reactive with the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Immunol* **139**:4027-4033.
6. **Baum, L. L.** 2010. Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Curr HIV/AIDS Rep* **7**:11-18.
7. **Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss.** 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* **391**:240.
8. **Binley, J. M., H. J. Ditzel, C. F. Barbas, 3rd, N. Sullivan, J. Sodroski, P. W. Parren, and D. R. Burton.** 1996. Human antibody responses to HIV type 1 glycoprotein 41 cloned in phage display libraries suggest three major epitopes are recognized and give evidence for conserved antibody motifs in antigen binding. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:911-924.
9. **Blattner, W., R. C. Gallo, and H. M. Temin.** 1988. HIV causes AIDS. *Science* **241**:515-516.
10. **Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer.** 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**:829-833.
11. **Bomsel, M., M. Heyman, H. Hocini, S. Lagaye, L. Belec, C. Dupont, and C. Desgranges.** 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* **9**:277-287.
12. **Bomsel, M., D. Tudor, A. S. Drillet, A. Alfsen, Y. Ganor, M. G. Roger, N. Mouz, M. Amacker, A. Chalifour, L. Diomede, G. Devillier, Z. Cong, Q. Wei, H. Gao, C. Qin, G. B. Yang, R. Zurbriggen, L. Lopalco, and S. Fleury.** 2011. Immunization with HIV-1

- gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* **34**:269-280.
13. **Bosch, M. L., P. L. Earl, K. Fargnoli, S. Picciafuoco, F. Giombini, F. Wong-Staal, and G. Franchini.** 1989. Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science* **244**:694-697.
 14. **Brasseur, R., M. Vandenbranden, B. Cornet, A. Burny, and J. M. Ruyschaert.** 1990. Orientation into the lipid bilayer of an asymmetric amphipathic helical peptide located at the N-terminus of viral fusion proteins. *Biochim Biophys Acta* **1029**:267-273.
 15. **Brunel, F. M., M. B. Zwick, R. M. Cardoso, J. D. Nelson, I. A. Wilson, D. R. Burton, and P. E. Dawson.** 2006. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J Virol* **80**:1680-1687.
 16. **Buchacher, A., R. Predl, K. Strutzenberger, W. Steinfellner, A. Trkola, M. Purtscher, G. Gruber, C. Tauer, F. Steindl, A. Jungbauer, and et al.** 1994. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:359-369.
 17. **Buchbinder, S. P., D. V. Mehrotra, A. Duerr, D. W. Fitzgerald, R. Mogg, D. Li, P. B. Gilbert, J. R. Lama, M. Marmor, C. Del Rio, M. J. McElrath, D. R. Casimiro, K. M. Gottesdiener, J. A. Chodakewitz, L. Corey, and M. N. Robertson.** 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.
 18. **Calarota, S., M. Jansson, M. Levi, K. Broliden, O. Libonatti, H. Wigzell, and B. Wahren.** 1996. Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:705-713.
 19. **Carr, C. M., C. Chaudhry, and P. S. Kim.** 1997. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14306-14313.
 20. **Cavacini, L. A., C. L. Emes, A. V. Wisniewski, J. Power, G. Lewis, D. Montefiori, and M. R. Posner.** 1998. Functional and molecular characterization of human monoclonal antibody reactive with the immunodominant region of HIV type 1 glycoprotein 41. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:1271-1280.
 21. **Chan, D. C., C. T. Chutkowski, and P. S. Kim.** 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15613-15617.
 22. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
 23. **Chen, C. H., M. L. Greenberg, D. P. Bolognesi, and T. J. Matthews.** 2000. Monoclonal antibodies that bind to the core of fusion-active glycoprotein 41. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:2037-2041.
 24. **Chen, C. H., T. J. Matthews, C. B. McDanal, D. P. Bolognesi, and M. L. Greenberg.** 1995. A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. *J Virol* **69**:3771-3777.
 25. **Cilliers, T., J. Nhlapo, M. Coetzer, D. Orlovic, T. Ketas, W. C. Olson, J. P. Moore, A. Trkola, and L. Morris.** 2003. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by

- human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* **77**:4449-4456.
26. **Clerici, M., C. Barassi, C. Devito, C. Pastori, S. Piconi, D. Trabattoni, R. Longhi, J. Hinkula, K. Broliden, and L. Lopalco.** 2002. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* **16**:1731-1741.
 27. **Cleveland, S. M., E. Buratti, T. D. Jones, P. North, F. Baralle, L. McLain, T. McInerney, Z. Durrani, and N. J. Dimmock.** 2000. Immunogenic and antigenic dominance of a nonneutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response. *Virology* **266**:66-78.
 28. **Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso.** 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.
 29. **Cohen, J.** 2003. Public health. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. *Science* **299**:1290-1291.
 30. **Colman, P. M., and M. C. Lawrence.** 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:309-319.
 31. **Cotropia, J., K. E. Ugen, S. Kliks, K. Broliden, P. A. Broliden, J. A. Hoxie, V. Srikantan, W. V. Williams, and D. B. Weiner.** 1996. A human monoclonal antibody to HIV-1 gp41 with neutralizing activity against diverse laboratory isolates. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **12**:221-232.
 32. **Dagleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
 33. **de Rosny, E., R. Vassell, S. Jiang, R. Kunert, and C. D. Weiss.** 2004. Binding of the 2F5 monoclonal antibody to native and fusion-intermediate forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for fusion-inducing conformational changes. *J Virol* **78**:2627-2631.
 34. **de Rosny, E., R. Vassell, P. T. Wingfield, C. T. Wild, and C. D. Weiss.** 2001. Peptides corresponding to the heptad repeat motifs in the transmembrane protein (gp41) of human immunodeficiency virus type 1 elicit antibodies to receptor-activated conformations of the envelope glycoprotein. *J Virol* **75**:8859-8863.
 35. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-666.
 36. **Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, Z. Zhang, W. A. O'Brien, L. Ratner, G. M. Shaw, and E. Hunter.** 2001. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J Virol* **75**:8605-8614.
 37. **Derrien, M., N. Pizzato, G. Dolcini, E. Menu, G. Chaouat, F. Lenfant, F. Barre-Sinoussi, and P. L. Bouteiller.** 2004. Human immunodeficiency virus 1 downregulates

- cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* **85**:1945-1954.
38. **Doms, R. W.** 2000. Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* **276**:229-237.
 39. **Doores, K. J., and D. R. Burton.** Variable loop glycan dependency of the broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies PG9 and PG16. *J Virol* **84**:10510-10521.
 40. **Eaton, A. M., K. E. Ugen, D. B. Weiner, T. Wildes, and J. A. Levy.** 1994. An anti-gp41 human monoclonal antibody that enhances HIV-1 infection in the absence of complement. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:13-18.
 41. **Eckert, D. M., and P. S. Kim.** 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**:777-810.
 42. **Eddleston, M., J. C. de La Torre, J. Y. Xu, N. Dorfman, A. Notkins, S. Zolla-Pazner, and M. B. Oldstone.** 1993. Molecular mimicry accompanying HIV-1 infection: human monoclonal antibodies that bind to gp41 and to astrocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:939-944.
 43. **Egan, M. A.** 2004. Current prospects for the development of a therapeutic vaccine for the treatment of HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:794-806.
 44. **Felgenhauer, M., J. Kohl, and F. Ruker.** 1990. Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41. *Nucleic Acids Res* **18**:4927.
 45. **Ferrantelli, F., R. Hofmann-Lehmann, R. A. Rasmussen, T. Wang, W. Xu, P. L. Li, D. C. Montefiori, L. A. Cavacini, H. Katinger, G. Stiegler, D. C. Anderson, H. M. McClure, and R. M. Ruprecht.** 2003. Post-exposure prophylaxis with human monoclonal antibodies prevented SHIV89.6P infection or disease in neonatal macaques. *Aids* **17**:301-309.
 46. **Ferrantelli, F., M. Kitabwalla, R. A. Rasmussen, C. Cao, T. C. Chou, H. Katinger, G. Stiegler, L. A. Cavacini, Y. Bai, J. Cotropia, K. E. Ugen, and R. M. Ruprecht.** 2004. Potent cross-group neutralization of primary human immunodeficiency virus isolates with monoclonal antibodies--implications for acquired immunodeficiency syndrome vaccine. *J Infect Dis* **189**:71-74.
 47. **Forthal, D. N., and C. Moog.** 2009. Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* **4**:388-393.
 48. **Freed, E. O., E. L. Delwart, G. L. Buchsacher, Jr., and A. T. Panganiban.** 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:70-74.
 49. **Frey, G., J. Chen, S. Rits-Volloch, M. M. Freeman, S. Zolla-Pazner, and B. Chen.** 2010. Distinct conformational states of HIV-1 gp41 are recognized by neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Nat Struct Mol Biol* **17**:1486-1491.
 50. **Frey, S., M. Marsh, S. Gunther, A. Pelchen-Matthews, P. Stephens, S. Orllepp, and T. Stegmann.** 1995. Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:1462-1472.
 51. **Gallo, S. A., C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell, and R. Blumenthal.** 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* **1614**:36-50.

52. **Geng Zhang, a. Y. C.** 2005. Monoclonal Antibodies Recognizing HIV-1 gp41 Could Inhibit Env-Mediated Syncytium Formation. *Tsinghua Science & Technology* **10**:512-516
53. **Ghalib Alkhatib, C. C., Christopher C. Broder, Yu Feng, Paul E. Kennedy, Philip M. Murphy, Edward A. Berger** 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP-1, MIP-1 Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1 *SCIENCE* **272**:1955-1958.
54. **Girard, M., B. Meignier, F. Barre-Sinoussi, M. P. Kieny, T. Matthews, E. Muchmore, P. L. Nara, Q. Wei, L. Rimsky, K. Weinhold, and et al.** 1995. Vaccine-induced protection of chimpanzees against infection by a heterologous human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**:6239-6248.
55. **Golding, H., M. Zaitseva, E. de Rosny, L. R. King, J. Manischewitz, I. Sidorov, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, D. S. Dimitrov, and C. D. Weiss.** 2002. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol* **76**:6780-6790.
56. **Gorny, M. K., V. Gianakakos, S. Sharpe, and S. Zolla-Pazner.** 1989. Generation of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:1624-1628.
57. **Gorny, M. K., and S. Zolla-Pazner.** 2000. Recognition by human monoclonal antibodies of free and complexed peptides representing the prefusogenic and fusogenic forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J Virol* **74**:6186-6192.
58. **Goudsmit, J., C. Debouck, R. H. Melen, L. Smit, M. Bakker, D. M. Asher, A. V. Wolff, C. J. Gibbs, Jr., and D. C. Gajdusek.** 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:4478-4482.
59. **Gray, E. S., P. L. Moore, R. A. Pantophlet, and L. Morris.** 2007. N-linked glycan modifications in gp120 of human immunodeficiency virus type 1 subtype C render partial sensitivity to 2G12 antibody neutralization. *J Virol* **81**:10769-10776.
60. **Green, L. L., M. C. Hardy, C. E. Maynard-Currie, H. Tsuda, D. M. Louie, M. J. Mendez, H. Abderrahim, M. Noguchi, D. H. Smith, Y. Zeng, and et al.** 1994. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* **7**:13-21.
61. **Gustchina, E., M. Li, J. M. Louis, D. E. Anderson, J. Lloyd, C. Frisch, C. A. Bewley, A. Gustchina, A. Wlodawer, and G. M. Clore.** 2010. Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS Pathog* **6**:e1001182.
62. **Haynes, B. F., J. Fleming, E. W. St Clair, H. Katinger, G. Stiegler, R. Kunert, J. Robinson, R. M. Scarce, K. Plonk, H. F. Staats, T. L. Ortel, H. X. Liao, and S. M. Alam.** 2005. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**:1906-1908.
63. **Hessell, A. J., E. G. Rakasz, D. M. Tehrani, M. Huber, K. L. Weisgrau, G. Landucci, D. N. Forthal, W. C. Koff, P. Poignard, D. I. Watkins, and D. R. Burton.** 2010. Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against

- mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J Virol* **84**:1302-1313.
64. **Hioe, C. E., S. Xu, P. Chigurupati, S. Burda, C. Williams, M. K. Gorny, and S. Zolla-Pazner.** 1997. Neutralization of HIV-1 primary isolates by polyclonal and monoclonal human antibodies. *Int Immunol* **9**:1281-1290.
 65. **Horal, P., B. Svennerholm, S. Jeansson, L. Rymo, W. W. Hall, and A. Vahlne.** 1991. Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol* **65**:2718-2723.
 66. **Huang, Y., W. A. Paxton, S. M. Wolinsky, A. U. Neumann, L. Zhang, T. He, S. Kang, D. Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N. R. Landau, J. Phair, D. D. Ho, and R. A. Koup.** 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* **2**:1240-1243.
 67. **Javaherian, K., A. J. Langlois, C. McDanal, K. L. Ross, L. I. Eckler, C. L. Jellis, A. T. Profy, J. R. Rusche, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, and et al.** 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6768-6772.
 68. **Jiang, S., K. Lin, N. Strick, and A. R. Neurath.** 1993. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* **365**:113.
 69. **Jiang, S., K. Lin, N. Strick, and A. R. Neurath.** 1993. Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41. *Biochem Biophys Res Commun* **195**:533-538.
 70. **Joos, B., A. Trkola, H. Kuster, L. Aceto, M. Fischer, G. Stiegler, C. Armbruster, B. Vcelar, H. Katinger, and H. F. Gunthard.** 2006. Long-term multiple-dose pharmacokinetics of human monoclonal antibodies (MAbs) against human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1773-1779.
 71. **Jowett, J. B., V. Planelles, B. Poon, N. P. Shah, M. L. Chen, and I. S. Chen.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**:6304-6313.
 72. **Jung, A., R. Maier, J. P. Vartanian, G. Bocharov, V. Jung, U. Fischer, E. Meese, S. Wain-Hobson, and A. Meyerhans.** 2002. Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**:144.
 73. **Kielian, M.** 2006. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology* **344**:38-47.
 74. **Kramer, V. G., N. B. Siddappa, and R. M. Ruprecht.** 2007. Passive immunization as tool to identify protective HIV-1 Env epitopes. *Curr HIV Res* **5**:642-655.
 75. **Land, A., and I. Braakman.** 2001. Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* **83**:783-790.
 76. **Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**:10373-10382.

77. **Li, H., H. Song, A. Heredia, N. Le, R. Redfield, G. K. Lewis, and L. X. Wang.** 2004. Synthetic bivalent CD4-mimetic miniproteins show enhanced anti-HIV activity over the monovalent miniprotein. *Bioconjug Chem* **15**:783-789.
78. **Lu, W., L. C. Arraes, W. T. Ferreira, and J. M. Andrieu.** 2004. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**:1359-1365.
79. **Luo, T., S. J. Anderson, and J. V. Garcia.** 1996. Inhibition of Nef- and phorbol ester-induced CD4 degradation by macrolide antibiotics. *J Virol* **70**:1527-1534.
80. **Lusso, P., P. L. Earl, F. Sironi, F. Santoro, C. Ripamonti, G. Scarlatti, R. Longhi, E. A. Berger, and S. E. Burastero.** 2005. Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* **79**:6957-6968.
81. **M, P.** 2005. Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). *virologie* **9**:457-472.
82. **Mansky, L. M., and H. M. Temin.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**:5087-5094.
83. **Martin, L., F. Stricher, D. Misse, F. Sironi, M. Pugniere, P. Barthe, R. Prado-Gotor, I. Freulon, X. Magne, C. Roumestand, A. Menez, P. Lusso, F. Veas, and C. Vita.** 2003. Rational design of a CD4 mimic that inhibits HIV-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes. *Nat Biotechnol* **21**:71-76.
84. **Mascola, J. R., G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S. S. Frankel, D. L. Birx, and M. G. Lewis.** 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* **6**:207-210.
85. **McCutchan, F. E., J. K. Carr, M. Bajani, E. Sanders-Buell, T. O. Harry, T. C. Stoeckli, K. E. Robbins, W. Gashau, A. Nasidi, W. Janssens, and M. L. Kalish.** 1999. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* **254**:226-234.
86. **Mehandru, S., T. Wrin, J. Galovich, G. Stiegler, B. Vcelar, A. Hurley, C. Hogan, S. Vasan, H. Katinger, C. J. Petropoulos, and M. Markowitz.** 2004. Neutralization profiles of newly transmitted human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *J Virol* **78**:14039-14042.
87. **Melikyan, G. B., M. Egelhofer, and D. von Laer.** 2006. Membrane-anchored inhibitory peptides capture human immunodeficiency virus type 1 gp41 conformations that engage the target membrane prior to fusion. *J Virol* **80**:3249-3258.
88. **Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen.** 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**:413-423.
89. **Menzo, S., A. Castagna, A. Monchetti, H. Hasson, A. Danise, E. Carini, P. Bagnarelli, A. Lazzarin, and M. Clementi.** 2004. Resistance and replicative capacity of HIV-1 strains selected in vivo by long-term enfuvirtide treatment. *New Microbiol* **27**:51-61.

90. **Miller, C. J., M. Marthas, J. Torten, N. J. Alexander, J. P. Moore, G. F. Doncel, and A. G. Hendrickx.** 1994. Intravaginal inoculation of rhesus macaques with cell-free simian immunodeficiency virus results in persistent or transient viremia. *J Virol* **68**:6391-6400.
91. **Miller, M. D., R. Geleziunas, E. Bianchi, S. Lennard, R. Hrin, H. Zhang, M. Lu, Z. An, P. Ingallinella, M. Finotto, M. Mattu, A. C. Finnefrock, D. Bramhill, J. Cook, D. M. Eckert, R. Hampton, M. Patel, S. Jarantow, J. Joyce, G. Ciliberto, R. Cortese, P. Lu, W. Strohl, W. Schleif, M. McElhaugh, S. Lane, C. Lloyd, D. Lowe, J. Osbourn, T. Vaughan, E. Emini, G. Barbato, P. S. Kim, D. J. Hazuda, J. W. Shiver, and A. Pessi.** 2005. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14759-14764.
92. **Montero, M., N. E. van Houten, X. Wang, and J. K. Scott.** 2008. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:54-84, table of contents.
93. **Morrison, S. L., M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, and V. T. Oi.** 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:6851-6855.
94. **Moulard, M., and E. Decroly.** 2000. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta* **1469**:121-132.
95. **Muster, T., F. Steindl, M. Purtscher, A. Trkola, A. Klima, G. Himmler, F. Rucker, and H. Katinger.** 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:6642-6647.
96. **Myszka, D. G., R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, and M. L. Doyle.** 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9026-9031.
97. **Nelson, J. D., F. M. Brunel, R. Jensen, E. T. Crooks, R. M. Cardoso, M. Wang, A. Hessel, I. A. Wilson, J. M. Binley, P. E. Dawson, D. R. Burton, and M. B. Zwick.** 2007. An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *J Virol* **81**:4033-4043.
98. **Nelson, J. D., H. Kinkead, F. M. Brunel, D. Leaman, R. Jensen, J. M. Louis, T. Maruyama, C. A. Bewley, K. Bowdish, G. M. Clore, P. E. Dawson, S. Frederickson, R. G. Mage, D. D. Richman, D. R. Burton, and M. B. Zwick.** 2008. Antibody elicited against the gp41 N-heptad repeat (NHR) coiled-coil can neutralize HIV-1 with modest potency but non-neutralizing antibodies also bind to NHR mimetics. *Virology* **377**:170-183.
99. **Oliva, A., A. L. Kinter, M. Vaccarezza, A. Rubbert, A. Catanzaro, S. Moir, J. Monaco, L. Ehler, S. Mizell, R. Jackson, Y. Li, J. W. Romano, and A. S. Fauci.** 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. *J Clin Invest* **102**:223-231.
100. **Opalka, D., A. Pessi, E. Bianchi, G. Ciliberto, W. Schleif, M. McElhaugh, R. Danzeisen, R. Geleziunas, M. Miller, D. M. Eckert, D. Bramhill, J. Joyce, J. Cook, W. Magilton, J. Shiver, E. Emini, and M. T. Esser.** 2004. Analysis of the HIV-1 gp41

- specific immune response using a multiplexed antibody detection assay. *J Immunol Methods* **287**:49-65.
101. **Oravec, T., M. Pall, and M. A. Norcross.** 1996. Beta-chemokine inhibition of monocytotropic HIV-1 infection. Interference with a postbinding fusion step. *J Immunol* **157**:1329-1332.
 102. **Palker, T. J., M. E. Clark, A. J. Langlois, T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes.** 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:1932-1936.
 103. **Pan, C., L. Cai, H. Lu, Z. Qi, and S. Jiang.** 2009. Combinations of the first and next generations of human immunodeficiency virus (HIV) fusion inhibitors exhibit a highly potent synergistic effect against enfuvirtide- sensitive and -resistant HIV type 1 strains. *J Virol* **83**:7862-7872.
 104. **Poumbourios, P., D. A. McPhee, and B. E. Kemp.** 1992. Antibody epitopes sensitive to the state of human immunodeficiency virus type 1 gp41 oligomerization map to a putative alpha-helical region. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:2055-2062.
 105. **Qi, Z., C. Pan, H. Lu, Y. Shui, L. Li, X. Li, X. Xu, S. Liu, and S. Jiang.** A recombinant mimetics of the HIV-1 gp41 prehairpin fusion intermediate fused with human IgG Fc fragment elicits neutralizing antibody response in the vaccinated mice. *Biochem Biophys Res Commun* **398**:506-512.
 106. **Queen, C., W. P. Schneider, H. E. Selick, P. W. Payne, N. F. Landolfi, J. F. Duncan, N. M. Avdalovic, M. Levitt, R. P. Junghans, and T. A. Waldmann.** 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:10029-10033.
 107. **Reeves, J. D., F. H. Lee, J. L. Miamidian, C. B. Jabara, M. M. Juntilla, and R. W. Doms.** 2005. Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J Virol* **79**:4991-4999.
 108. **Regoes, R. R., and S. Bonhoeffer.** 2005. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol* **13**:269-277.
 109. **Rerks-Ngarm, S., P. Pitisuttithum, S. Nitayaphan, J. Kaewkungwal, J. Chiu, R. Paris, N. Prensri, C. Namwat, M. de Souza, E. Adams, M. Benenson, S. Gurunathan, J. Tartaglia, J. G. McNeil, D. P. Francis, D. Stablein, D. L. Birx, S. Chunsuttiwat, C. Khamboonruang, P. Thongcharoen, M. L. Robb, N. L. Michael, P. Kunasol, and J. H. Kim.** 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **361**:2209-2220.
 110. **Roben, P., J. P. Moore, M. Thali, J. Sodroski, C. F. Barbas, 3rd, and D. R. Burton.** 1994. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:4821-4828.
 111. **Robinson, W. E., Jr., T. Kawamura, M. K. Gorny, D. Lake, J. Y. Xu, Y. Matsumoto, T. Sugano, Y. Masuho, W. M. Mitchell, E. Hersh, and et al.** 1990. Human monoclonal antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane

- glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3185-3189.
112. **Robinson, W. E., Jr., T. Kawamura, D. Lake, Y. Masuho, W. M. Mitchell, and E. M. Hersh.** 1990. Antibodies to the primary immunodominant domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *J Virol* **64**:5301-5305.
 113. **Roguska, M. A., J. T. Pedersen, C. A. Keddy, A. H. Henry, S. J. Searle, J. M. Lambert, V. S. Goldmacher, W. A. Blattler, A. R. Rees, and B. C. Guild.** 1994. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:969-973.
 114. **Ruprecht, R. M., F. Ferrantelli, M. Kitabwalla, W. Xu, and H. M. McClure.** 2003. Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine* **21**:3370-3373.
 115. **Ruprecht, R. M., R. Hofmann-Lehmann, B. A. Smith-Franklin, R. A. Rasmussen, V. Liska, J. Vlasak, W. Xu, T. W. Baba, A. L. Chenine, L. A. Cavacini, M. R. Posner, H. Katinger, G. Stiegler, B. J. Bernacky, T. A. Rizvi, R. Schmidt, L. R. Hill, M. E. Keeling, D. C. Montefiori, and H. M. McClure.** 2001. Protection of neonatal macaques against experimental SHIV infection by human neutralizing monoclonal antibodies. *Transfus Clin Biol* **8**:350-358.
 116. **Salmon-Ceron, D., C. Durier, C. Desaint, L. Cuzin, M. Surenaud, N. B. Hamouda, J. D. Lelievre, B. Bonnet, G. Pialoux, I. Poizot-Martin, J. P. Aboulker, Y. Levy, and O. Launay.** 2010. Immunogenicity and safety of an HIV-1 lipopeptide vaccine in healthy adults: a phase 2 placebo-controlled ANRS trial. *AIDS* **24**:2211-2223.
 117. **Sanchez-Pescador, R., M. D. Power, P. J. Barr, K. S. Steimer, M. M. Stempien, S. L. Brown-Shimer, W. W. Gee, A. Renard, A. Randolph, J. A. Levy, and et al.** 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**:484-492.
 118. **Sanders, M. E., M. W. Makgoba, S. O. Sharrow, D. Stephany, T. A. Springer, H. A. Young, and S. Shaw.** 1988. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* **140**:1401-1407.
 119. **Sanders, R. W., M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger, K. O. Lloyd, P. D. Kwong, and J. P. Moore.** 2002. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**:7293-7305.
 120. **Saphire, E. O., P. W. Parren, R. Pantophlet, M. B. Zwick, G. M. Morris, P. M. Rudd, R. A. Dwek, R. L. Stanfield, D. R. Burton, and I. A. Wilson.** 2001. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**:1155-1159.
 121. **Sattentau, Q. J., and J. P. Moore.** 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* **174**:407-415.

122. **Sattentau, Q. J., S. Zolla-Pazner, and P. Poignard.** 1995. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* **206**:713-717.
123. **Scanlan, C. N., R. Pantophlet, M. R. Wormald, E. Ollmann Saphire, R. Stanfield, I. A. Wilson, H. Katinger, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and D. R. Burton.** 2002. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**:7306-7321.
124. **Schaal, H., M. Klein, P. Gehrman, O. Adams, and A. Scheid.** 1995. Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J Virol* **69**:3308-3314.
125. **Schellekens, P. T., M. T. Roos, F. De Wolf, J. M. Lange, and F. Miedema.** 1990. Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men. *J Clin Immunol* **10**:121-127.
126. **Schibli, D. J., and W. Weissenhorn.** 2004. Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Mol Membr Biol* **21**:361-371.
127. **Shen, R., E. R. Drelichman, D. Bimczok, C. Ochsenbauer, J. C. Kappes, J. A. Cannon, D. Tudor, M. Bomsel, L. E. Smythies, and P. D. Smith.** 2010. GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium. *J Immunol* **184**:3648-3655.
128. **Shnaper, S., K. Sackett, S. A. Gallo, R. Blumenthal, and Y. Shai.** 2004. The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively. *J Biol Chem* **279**:18526-18534.
129. **Sinangil, F., A. Loyter, and D. J. Volsky.** 1988. Quantitative measurement of fusion between human immunodeficiency virus and cultured cells using membrane fluorescence dequenching. *FEBS Lett* **239**:88-92.
130. **Sodora, D. L., A. Gettie, C. J. Miller, and P. A. Marx.** 1998. Vaginal transmission of SIV: assessing infectivity and hormonal influences in macaques inoculated with cell-free and cell-associated viral stocks. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 1**:S119-123.
131. **Srivastava, K. K., R. Fernandez-Larsson, D. M. Zinkus, and H. L. Robinson.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 NL4-3 replication in four T-cell lines: rate and efficiency of entry, a major determinant of permissiveness. *J Virol* **65**:3900-3902.
132. **Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, and et al.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.
133. **Stiegler, G., R. Kunert, M. Purtscher, S. Wolbank, R. Voglauer, F. Steindl, and H. Katinger.** 2001. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**:1757-1765.
134. **Stockmann, M., H. Schmitz, M. Fromm, W. Schmidt, G. Pauli, P. Scholz, E. O. Riecken, and J. D. Schulzke.** 2000. Mechanisms of epithelial barrier impairment in HIV infection. *Ann N Y Acad Sci* **915**:293-303.

135. **Sugano, T., Y. Masuho, Y. Matsumoto, D. Lake, C. Gschwind, E. A. Petersen, and E. M. Hersh.** 1988. Human monoclonal antibody against glycoproteins of human immunodeficiency virus. *Biochem Biophys Res Commun* **155**:1105-1112.
136. **Sun, Z. Y., K. J. Oh, M. Kim, J. Yu, V. Bruslic, L. Song, Z. Qiao, J. H. Wang, G. Wagner, and E. L. Reinherz.** 2008. HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane. *Immunity* **28**:52-63.
137. **Taniguchi, Y., S. Zolla-Pazner, Y. Xu, X. Zhang, S. Takeda, and T. Hattori.** 2000. Human monoclonal antibody 98-6 reacts with the fusogenic form of gp41. *Virology* **273**:333-340.
138. **Tian, Y., C. V. Ramesh, X. Ma, S. Naqvi, T. Patel, T. Cenizal, M. Tiscione, K. Diaz, T. Crea, E. Arnold, G. F. Arnold, and J. W. Taylor.** 2002. Structure-affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J Pept Res* **59**:264-276.
139. **Tomizuka, K., T. Shinohara, H. Yoshida, H. Uejima, A. Ohguma, S. Tanaka, K. Sato, M. Oshimura, and I. Ishida.** 2000. Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:722-727.
140. **Veazey, R. S., R. J. Shattock, M. Pope, J. C. Kirijan, J. Jones, Q. Hu, T. Ketas, P. A. Marx, P. J. Klasse, D. R. Burton, and J. P. Moore.** 2003. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med* **9**:343-346.
141. **Vincent, N., A. Kone, B. Chanut, F. Lucht, C. Genin, and E. Malvoisin.** 2008. Antibodies purified from sera of HIV-1-infected patients by affinity on the heptad repeat region 1/heptad repeat region 2 complex of gp41 neutralize HIV-1 primary isolates. *AIDS* **22**:2075-2085.
142. **Vita, C., E. Drakopoulou, J. Vizzavona, S. Rochette, L. Martin, A. Menez, C. Roumestand, Y. S. Yang, L. Ylisastigui, A. Benjouad, and J. C. Gluckman.** 1999. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13091-13096.
143. **Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, S. Cole, and M. Alizon.** 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**:9-17.
144. **Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.
145. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426-430.
146. **Welch, B. D., A. P. VanDemark, A. Heroux, C. P. Hill, and M. S. Kay.** 2007. Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16828-16833.
147. **Wild, C., T. Oas, C. McDanal, D. Bolognesi, and T. Matthews.** 1992. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10537-10541.

148. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9770-9774.
149. **Wilk, T., T. Pfeiffer, A. Bukovsky, G. Moldenhauer, and V. Bosch.** 1996. Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology* **218**:269-274.
150. **Xu, J. Y., M. K. Gorny, T. Palker, S. Karwowska, and S. Zolla-Pazner.** 1991. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol* **65**:4832-4838.
151. **Yamada, T., N. Watanabe, T. Nakamura, and A. Iwamoto.** 2004. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via humoral immune epitope of Nef protein expressed on cell surface. *J Immunol* **172**:2401-2406.
152. **Yuan, W., S. Craig, Z. Si, M. Farzan, and J. Sodroski.** 2004. CD4-induced T-20 binding to human immunodeficiency virus type 1 gp120 blocks interaction with the CXCR4 coreceptor. *J Virol* **78**:5448-5457.
153. **Zhang, H., and K. A. Gallo.** 2001. Autoinhibition of mixed lineage kinase 3 through its Src homology 3 domain. *J Biol Chem* **276**:45598-45603.
154. **Zhang, M. Y., B. K. Vu, A. Choudhary, H. Lu, M. Humbert, H. Ong, M. Alam, R. M. Ruprecht, G. Quinnan, S. Jiang, D. C. Montefiori, J. R. Mascola, C. C. Broder, B. F. Haynes, and D. S. Dimitrov.** 2008. Cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing human monoclonal antibody that recognizes a novel conformational epitope on gp41 and lacks reactivity against self-antigens. *J Virol* **82**:6869-6879.
155. **Zhang, M. Y., Y. Wang, M. K. Mankowski, R. G. Ptak, and D. S. Dimitrov.** 2009. Cross-reactive HIV-1-neutralizing activity of serum IgG from a rabbit immunized with gp41 fused to IgG1 Fc: possible role of the prolonged half-life of the immunogen. *Vaccine* **27**:857-863.
156. **Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor, and K. H. Roux.** 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15812-15817.
157. **Zwick, M. B., A. F. Labrijn, M. Wang, C. Spencehauer, E. O. Saphire, J. M. Binley, J. P. Moore, G. Stiegler, H. Katinger, D. R. Burton, and P. W. Parren.** 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**:10892-10905.