Coévolution entre les glycoprotéines d'enveloppe du VIH et les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région du glycane N332

Claire Rousset

▶ **To cite this version:**

Claire Rousset. Coévolution entre les glycoprotéines d'enveloppe du VIH et les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région du glycane N332. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV071 . tel-02127494

HAL Id: tel-02127494
https://theses.hal.science/tel-02127494

Submitted on 13 May 2019

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie structurale et nanobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Claire Rousset

Thèse dirigée par **Pascal Poignard**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**
dans **l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Coévolution entre les glycoprotéines d'enveloppe du VIH et les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région du glycane N332

Thèse soutenue publiquement le **17 décembre 2018**
devant le jury composé de :

Pr Winfried WEISSENHORN
Professeur, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, Président
Dr Christiane MOOG
Directrice de recherche, Institut de Virologie, Strasbourg, Rapporteuse
Pr Francis BARIN
Professeur des universités praticien hospitalier, Université François Rabelais, CHU Bretonneau, Tours, Rapporteur
Dr Bernard VERRIER
Directeur de recherche, Institut de Biologie et de Chimie des Protéines, Lyon, Examinateur
Pr Pascal Poignard
Professeur des universités praticien hospitalier, Institut de Biologie Structurale, Institut de Biologie et de Pathologie, Grenoble, France, Directeur de thèse

Sommaire

I. INTRODUCTION 9

Partie 1) Le VIH et sa glycoprotéine d'enveloppe 9
A) L'infection par le VIH et le SIDA 9
B) La neutralisation du VIH par les anticorps 17
C) La structure du trimère d'enveloppe 21
D) Les glycanes du trimère d'enveloppe 25
Partie 2) La réponse humorale aux infections 31
A) Les immunoglobulines et leurs gènes 31
B) L'activation et la maturation des lymphocytes B 37
C) Le devenir des cellules du centre germinatif 41
Partie 3) La neutralisation à large spectre 43
A) La neutralisation à large spectre au cours de l'infection 43
B) Les anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre 47
C) Le développement des anticorps neutralisants à large spectre dans l'infection par le VIH 51
D) L'induction d'anticorps neutralisants à large spectre par vaccination 59
Partie 4) Les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 65
A) Les caractéristiques des anticorps ciblant la région N332 65
B) Les épitopes de la région N332 71
C) La maturation des lignées ciblant la région N332 81
D) Conclusions sur les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 et description du travail de thèse 85

II. MATERIELS ET METHODES 87

Partie 1) Protocole C de l'International AIDS Vaccine Initiative 87
Partie 2) Isolement des anticorps et clonage des gènes d'*env* autologues 88
Partie 3) Production des anticorps monoclonaux et des pseudovirus et test de neutralisation 91
Partie 4) Purification des gp120 recombinantes 96

III. TRAVAUX SUR LE DONNEUR PC76 99

Partie 1) Informations préliminaires sur la lignée PCDN 99
Partie 2) Résultats 111
A) Données complémentaires 111
B) Etude du paratope des anticorps PCDN de PC76 117
Partie 3) Discussion 127

IV. TRAVAUX SUR LE DONNEUR PC94 131

Partie 1) Données préliminaires 131
Partie 2) Résultats 137
A) Cartographie de l'activité neutralisante à large spectre du sérum de PC94 137
B) Isolement des anticorps neutralisants et sélection des lignées d'anticorps d'intérêt 139
C) Activité neutralisante des anticorps 145
D) Cartographie de l'épitope 153
Partie 3) Discussion 161

V. CONCLUSION GENERALE 171

Résumé

Le VIH est la cause de la pandémie de SIDA depuis les années 1980. Avec plus d'un million de nouvelles infections chaque année, un vaccin prophylactique est indispensable pour bloquer de façon définitive la propagation du virus. Parmi les stratégies vaccinales, l'induction d'anticorps neutralisants à large spectre est une des plus prometteuses, car ceux-ci pourraient protéger contre l'infection par la grande diversité génétique des souches de VIH circulantes dans le monde. A ce jour, aucun immunogène n'a permis l'induction de tels anticorps, mais ils ont été isolés à partir de personnes infectées par le VIH. En effet, une faible fraction d'individus infectés développe des anticorps neutralisants à large spectre qui ciblent des régions vulnérables et conservées de la glycoprotéine d'enveloppe. La région du patch riche en mannose, centrée autour du glycane en position N332 de la gp120, est la plus fréquemment ciblée, et est à cet égard attractive d'un point de vue vaccinal.

Afin de mieux comprendre comment se développent les anticorps ciblant le patch riche en mannose, nous avons étudié un donneur sélectionné de la cohorte du Protocole C de l'International AIDS Vaccine Initiative, et ayant une activité neutralisante sérique exceptionnelle. Nous avons isolé, à partir des cellules sanguines de cet individu, deux lignées d'anticorps ciblant la région N332, que nous avons caractérisées pour leur activité neutralisante et dont nous avons cartographié l'épitope. Nous avons également cartographié le paratope d'une lignée d'anticorps issue d'un autre donneur du Protocole C ciblant également la région N332. Nos résultats font apparaître la diversité de solutions adoptées pour atteindre une neutralisation à large spectre contre cette région. Les études de lignées, telles que nous l'avons entrepris, permettent d'appréhender comment la coévolution anticorps-virus conduit à la sélection d'anticorps neutralisants à large spectre. Le but ultime est d'utiliser les connaissances ainsi générées, pour mettre au point des immunogènes et des protocoles d'immunisations, visant à induire des lignées d'anticorps spécifiques et à conduire leur évolution vers la neutralisation à large spectre.

Mots clés

VIH - SIDA - Vaccin - Anticorps neutralisants à large spectre - Région N332 - Lymphocytes B - Coévolution

Abstract

HIV has been the cause of the AIDS pandemic since the 1980s. With over a million new infections each year, a prophylactic vaccine is needed to stop the virus spread. Among vaccine strategies, the induction of broadly neutralizing antibodies is one of the most promising, as they could protect against infection by the huge genetic diversity of circulating HIV strains. To date, no immunogen has induced such antibodies, but they have been isolated from HIV infected people. Indeed, a small fraction of infected individuals eventually develops broadly neutralizing antibodies that target vulnerable and conserved sites of the envelope glycoprotein. The region of the high-mannose patch, centred around a glycan at position N332 of gp120, is the most frequently targeted, and is therefore attractive from a vaccination standpoint.

In order to better understand how antibodies targeting the high-mannose patch develop, we studied a donor selected from the International AIDS Vaccine Initiative Protocol C cohort with exceptional serum neutralizing activity. We isolated two antibody lineages targeting the N332 region from this individual's blood cells, which we characterized for their neutralizing activity and mapped their epitope. We also mapped the paratope of an antibody lineage from another Protocol C donor, also targeting the N332 region. Our results show the great diversity of solutions to achieve broad neutralization against this region. Lineage studies, as we have undertaken, provide an understanding of how antibody-virus coevolution leads to the selection of broadly neutralizing antibodies. The ultimate goal is to use this knowledge to develop immunogens and immunization protocols, to induce specific antibody lineage and drive their evolution towards broad neutralization.

Keywords

HIV - AIDS - Vaccine - Broadly neutralizing antibodies - N332 region - B cells - Coevolution

Remerciements

Tout d'abord, je remercie infiniment Pascal Poignard de m'avoir proposé ce foisonnant sujet de thèse pour écrire ensemble ce nouveau chapitre à Grenoble. Merci d'avoir su orienter mon travail avec optimisme et discernement pour me permettre de mûrir une réflexion scientifique de qualité.

Remerciements tout particuliers à Marlyse Buisson qui a connu avec moi les tout premiers balbutiements de notre équipe en 2015. Merci à celles et ceux qui sont venus démultiplier les forces de notre équipe, Audrey Cappelletti, Romy Rouzeau, Sébastian Dergan Dylon, Axelle Amen, Chloé Wackenheim et Fanny Andry. Ce travail n'aurait pas été possible sans vous.

Je remercie les rapporteurs Christiane Moog et Francis Barin d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie les examinateurs de cette thèse, Bernard Verrier et Winfried Weissenhorn, qui ont aussi suivi annuellement l'évolution de mon travail et m'ont offert des conseils avisés. Merci à Winfried de m'avoir accueilli dans ton laboratoire pour quelques semaines fin 2015.

Ma plus grande reconnaissance va à Elise Landais. Ton énergie, ta ténacité m'impressionnent. Tu as été ma mentor au Scripps Research Institute à San Diego pendant 4 mois et bien après mon retour à Grenoble, quand je me suis efforcée de suivre tes pas. Ce séjour en Californie a aussi été l'occasion de nombreuses et enrichissantes rencontres :

Un grand merci à Rotimi Omorodion, Lorena Ver, Jeffrey Umotoy, Sasha Moola, Ben Murrell, Rich Wyatt, Javier Guenaga, Kimmo Rantalainen, Zack Berndsen, Barbara Carrette, et leurs chefs d'équipe Dennis Burton, Ian Wilson et Andrew Ward ainsi qu'à la communauté internationale de la recherche sur le SIDA avec qui j'ai pu échanger au Keystone Symposium.

J'aimerais aussi remercier Cécile Morlot et Thierry Vernet d'avoir admirablement bien encadré mes travaux de Master 1 et de m'avoir transmis votre goût pour la recherche.

Enfin et surtout, je remercie chaleureusement tous les collègues du CIBB, en premier lieu Rob Ruigrok, Jean-Marie Bourhis, Francine Gérard, Thibaut Crépin et Nicolas Tarbouriech, parce que vous avez cru en moi et m'avez permis de faire partie de ce que je considère comme une deuxième famille. Merci à Amélie, Carla, Nicolas, Caroline, Pierre, Philippe, Aymeric, Laura et tant d'autres qui sont passés par là, vous égayez les journées et les remplissez d'amitié.

Liste des abréviations

ADCC	Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity Activité cytotoxique à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Activation induced cytidine deaminase
ARN	Acide ribonucléique
BCR	B cell receptor : récepteur des lymphocytes B
CCR5	Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CD4	Cluster de Différenciation 4
CD4bs	CD4 binding site : site de liaison au CD4
CDR	Complementary Determining Region
CHO	Cellules d'ovaire de hamster
CRF	Circulating recombinant forms : Formes Circulantes Recombinantes
CXCR4	Récepteur à C-X-C chimiokine de type 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Fab	Fragment antigen-binding : Fragment de liaison à l'antigène
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting Tri cellulaire activé par fluorescence
Fc	Fraction cristallisable
FR	Framework Region : Région charpente
Glc	Glucose
GlcNac	N-Acétylglucosamine
GnTI	N-acétylglucosaminyltransferase I
HC	Heavy chain : chaîne lourde
HEK	Humain embryonic kidney : Cellules humaines embryonnaires de reins
HLA	Human leukocyte antigen : antigène de leucocytes humains
HR	Heptad repeat : Répétition héptade
IAVI	International AIDS Vaccine Initiative
IC	Concentration inhibitrice
ID	Dilution inhibitrice
Ig	Immunoglobuline
IMGT	The international ImMunoGeneTics information system
Indels	Insertions et délétions
KC	Kappa light chain : chaîne légère kappa
LB	Lyosgeny broth medium
LC	Lambda light chain : chaîne légère lambda
Man	Mannose
MPER	Membrane Proximal External Region

mpi	mois post-infection
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell Cellules Mononucléées du sang périphérique
PCR	Polymerase chain reaction : amplification en chaîne par polymérase
PDB	Protein Data Bank
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SIV	Virus de l'Immunodéficience Simienne
SSR	Séquence signal de recombinaison
UCA	Unmutated Common Ancestor : ancêtre commun non muté
UNG	Uracile DNA glycosylase
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WT	Wild Type : sauvage

I. INTRODUCTION

Partie 1) Le VIH et sa glycoprotéine d'enveloppe

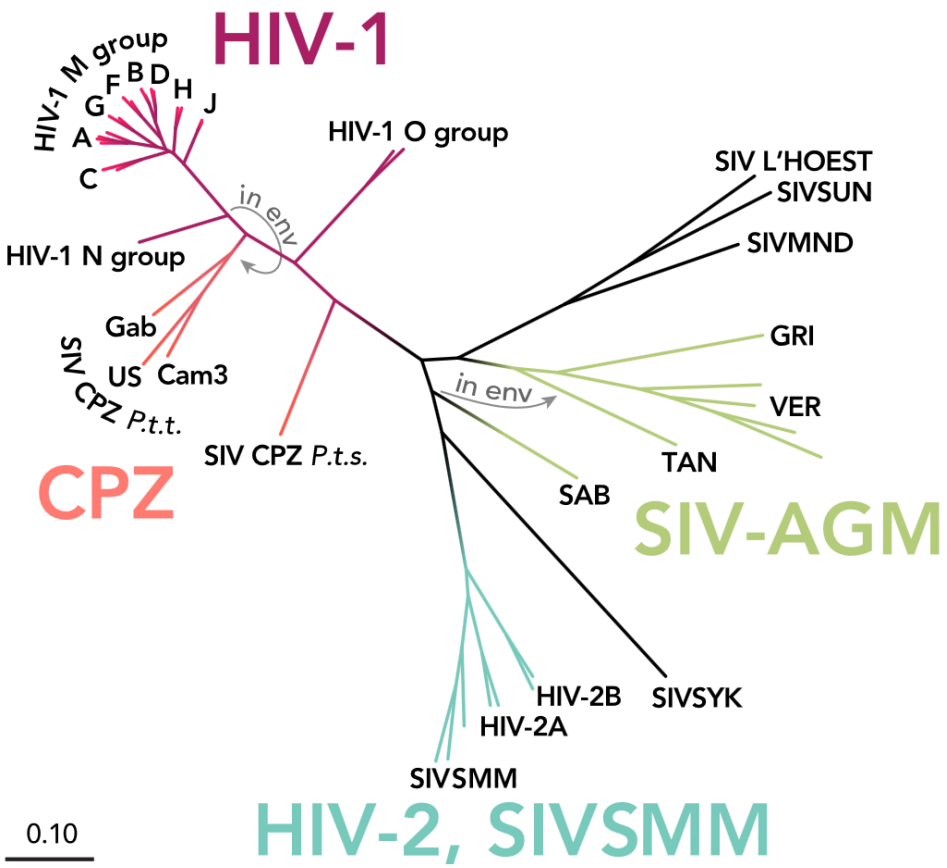
A) L'infection par le VIH et le SIDA

Le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) est un ensemble de manifestations d'infections opportunistes et de cancers liés à un affaiblissement du système immunitaire qui en absence de traitement conduit à la mort. L'agent étiologique du SIDA est le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) isolé pour la première fois en 1983 *(Barré-Sinoussi, Montagnier, 1983, Science ; Popovic, Gallo, Science, 1984)*.

- **Origine zoonotique**

Le VIH-1 est un virus zoonotique qui a émergé chez l'humain après des franchissements répétés de la barrière inter-espèce par des virus de l'immunodéficience simienne (SIV) de chimpanzés et gorilles. Ces transmissions distinctes ont donné lieu à la propagation de quatre groupes de VIH-1 chez l'humain : groupes M, O, N et P (Figure I-1). L'épidémie de VIH-1 de groupe M a débuté par la transmission à l'homme d'un virus de chimpanzés en Afrique centrale dans les années 1920 *(Sharp, CSH perspectives, 2011).* Elle s'est ensuite disséminé sur tous les continents et représente aujourd'hui la majorité des infections dans le monde.

Signe de l'extrême diversité génétique du VIH, le groupe M est subdivisé en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et 49 formes recombinantes (CRF) (Figure I-1). Le sous-type B est prédominant dans la plupart des pays occidentaux en Europe, Amérique, et Australie. Le sous-type C est majoritaire au Sud de l'Afrique et le sous-type A prédomine en Afrique de l'Ouest, centrale et de l'Est. Le VIH-2, moins virulent, isolé en 1986 en Afrique de l'Ouest *(Clavel, Science, 1986),* provient d'un virus infectant des macaques sooty mangabey.



I-1 Arbre phylogénétique des virus HIV (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et SIV (Virus de l'Immunodéficience Simienne) de chimpanzé (CPZ), du signe vert (AGM) et du macaque sooty mangabey (SMM). Adapté du travail du Theoritical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Compendium 1991

- **Organisation génétique du VIH**

Le VIH est un virus enveloppé d'environ 100-150 nm de la famille des Rétrovirus et du genre Lentivirus (Figure I-2). Son génome diploïde est composé d'un dimère d'ARN simple brin d'une dizaine de kilobases qui contient de nombreux gènes disposés sur les trois cadres de lecture *(Vogt, Retroviruses, 1997)*. Les protéines structurales sont codées par les gènes *gag*, *pol* et *env.* Le gène *gag* code notamment pour la protéine de matrice, de capside et la nucléocapside. La polyprotéine Gag-Pol comprend la protéase, la reverse transcriptase et l'intégrase. *Env* code pour la protéine d'enveloppe composée d'un hétérotrimère de trois gp120 et trois gp41 dont nous reparlerons en détail. Le VIH produit aussi des protéines régulatrices Tat et Rev et des protéines accessoires Vif, Vpr, Vpu, Vpx et Nef. De nombreuses séquences cis-régulatrices modulent l'expression des gènes et des sites de liaison à des protéines virales.

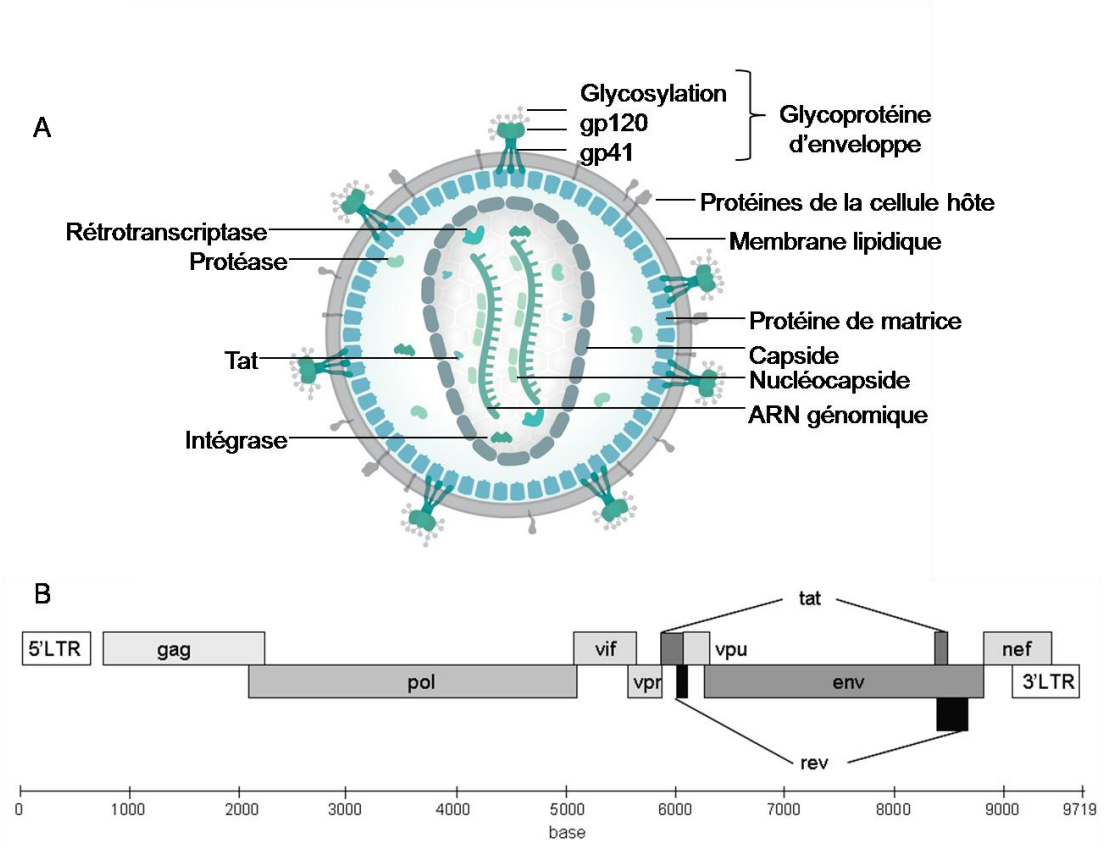


Figure I-2 : A) Organisation du virion mature de VIH, adapté d'une illustration de Thomas Splettstoesser, B) Organisation du génome du VIH-1, adapté de Korber, and al., Human retroviruses and AIDS, Numbering positions in HIV relative to HXB2CG, p102 (1998).

▪ Cellules cibles

Le tropisme du VIH est déterminé par sa liaison à des récepteurs à la surface cellulaire : le CD4 et un corécepteur CCR5 ou CXCR4. Les cellules cibles sont les lymphocytes T auxiliaires, les cellules dendritiques, les macrophages et les astrocytes dans le cerveau. Le rôle biologique du récepteur membranaire CD4 est de stabiliser l'interaction entre le récepteur des lymphocytes T et le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) des cellules présentatrices de l'antigène. Il est organisé en domaines de types immunoglobulines. Les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 sont des récepteurs aux chimiokines couplés à des protéines G. Le tropisme pour le corécepteur CCR5 correspond généralement à des virus présents en début d'infection. Le corécepteur CCR5 est préférentiellement exprimé par les lymphocytes T CD4 mémoires *(Douek, Annu Rev Immunol, 2003).* Un allèle de CCR5 naturellement présent en faible nombre dans la population protège de l'infection s'il est exprimé de façon homozygote. Au cours de l'infection, l'apparition tardive de virus à tropisme CXCR4, plus pathogènes, est fréquente et entraîne la déplétion d'une plus large population de lymphocytes T CD4 naïfs et mémoires, induisant une plus rapide dégradation de l'état clinique *(Blaak, PNAS, 2000).*

▪ Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire débute par l'attachement du virion au récepteur CD4 et au corécepteur par la protéine d'enveloppe. Celle-ci induit la fusion des membranes virales et cellulaires, une étape que nous aborderons en détail dans la partie consacrée au trimère d'enveloppe. Le matériel viral est alors relargué dans la cellule et décapsidé. L'ARN migre sur les microtubules en direction du noyau et est simultanément rétrotranscrit par la rétrotranscriptase en ADN double brin avant d'être importé dans le noyau. Pour son initiation, la rétrotrancriptase utilise comme amorce un ARN de transfert de la lysine de la cellule hôte *(Mirande, Virologie, 2008).* Une fois dans le noyau, l'ADN viral est recombiné à l'ADN génomique par l'intégrase sur des sites de haute activité transcriptionnelle de l'euchromatine *(Engelman, CMLS, 2018).* L'ADN viral est ensuite transcrit par la machinerie cellulaire, dont l'ARN polymérase II, en transcrits messagers et en ARN génomique viral. La protéine virale Tat et les facteurs de transcriptions humains régulent la transcription permettant une forte expression des gènes viraux. Les ARN transcrits sont exportés dans le cytoplasme à l'aide de la protéine virale Rev. L'ARN messager de la protéine d'enveloppe est traduit dans le réticulum endoplasmique et y ancre son peptide signal dans la membrane lipidique. La protéine d'enveloppe subit des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi avant d'être transportée à la membrane plasmique. Le transcrit gag-pol est traduit par des ribosomes libres, en polyprotéines qui migrent à la membrane plasmique et s'associent avec deux molécules d'ARN génomique viral pour l'encapsidation. Le virion néoformé bourgeonne en emportant la membrane lipidique de la cellule hôte et est libéré dans le milieu extracellulaire.

La production de nombreux virions est lytique pour la cellule hôte. Les virions restent immatures tant que la protéase virale qu'ils incorporent n'a pas clivé les polyprotéines en protéines fonctionnelles. Le trimère d'enveloppe est la seule protéine virale exposée à la surface du virion, mais le virion peut incorporer des protéines membranaires cellulaires *(Ott, Rev Med Virol, 1997 ; Linde, J Proteome Res, 2013)*. Plutôt que de circuler librement dans le milieu extracellulaire pour rencontrer aléatoirement une cellule cible, le virion peut être transféré rapidement de cellule à cellule au niveau d'une jonction intercellulaire appelée dans ce cas synapse virale. La formation de syncytia a aussi été reportée *(Bracq, Front Immunol, 2018).* Ces cellules multinucléées sont générées par la fusion d'une cellule infectée et d'une cellule non infectée. L'attachement des récepteurs de la cellule cible avec les protéines d'enveloppe ancrées à la membrane plasmique de la cellule donneuse entraîne la fusion des deux membranes plasmiques.

▪ Transmission

Le VIH se transmet principalement par relations sexuelles, mais aussi par transfusion sanguine ou de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement. Il y a une assez grande disparité de risque selon le type d'exposition sexuelle. L'infection est d'autant plus probable que la charge virale du partenaire séropositif est élevée, ce qui est le cas notamment pendant la primo-infection. Malgré l'exposition à de nombreux virus, dans la plupart des cas l'infection est expliquée par le franchissement de la barrière muqueuse par un virus unique à tropisme CCR5 appelé virus transmis. La sélection d'un seul virus du donneur pour l'infection du receveur est un extraordinaire goulot d'étranglement génétique *(Carlson, Science, 2014 ; Theys, Curr Op Virol, 2018)*.

▪ Stades de l'infection par le VIH

Premier stade de l'installation de l'infection, la primo-infection est caractérisée par une très haute charge virale, jusqu'à 10 millions de copies d'ARN/mL de plasma, et pour 50 à 70% des sujets, des symptômes peu typiques comme de la fièvre, une pharyngite ou une perte de poids (Figure I-3) *(Kahn, N Engl Med, 1998).* Les premières semaines de l'infection sont caractérisées par la déplétion d'une grande partie des lymphocytes T CD4 mémoires des muqueuses digestives ce qui en fragilise la barrière immunitaire *(Brenchley, Nat Med, 2006)*. Parallèlement, des provirus s'intègrent aux génomes de certaines cellules infectées, notamment des lymphocytes T CD4 mémoires à longue durée de vie *(Chun, Nature, 1997 ; Finzi, Science, 1997).* Ces virus ne se répliquent pas, laissant la cellule vivante, et échappant à la reconnaissance par le système immunitaire et à l'action des traitements antirétroviraux. Ce réservoir de virus latents est difficile à éliminer et explique en grande partie que le système immunitaire ne peut surmonter l'infection *(Chun, PNAS, 1998)*.

Après la primo-infection, la charge virale diminue et se stabilise aux alentours de quelques dizaines de milliers de copies par mL. Cette valeur varie d'un individu à l'autre et est prédictive de la rapidité de la progression vers le stade SIDA *(Lyles, J Infect Dis, 2000)*. Débute alors une phase presque asymptomatique d'une durée qui peut varier de quelques mois à quelques années. Pendant ce temps, la réplication virale est continue et importante avec jusqu'à plusieurs milliards de virions libérés dans la circulation chaque jour et les lymphocytes T CD4 sont détruits progressivement *(Ho, Nature, 1995).*

Puis, lorsque le taux de lymphocytes T CD4 franchit un seuil critique autour de 200 cellules par mm^3, les symptômes d'une immunodéficience sévère apparaissent. Des cancers et des infections opportunistes apparaissent, qui ne se développent normalement pas chez les personnes immunocompétentes. Elles sont dues à toutes sortes de pathogènes : bactériens (tuberculose), parasitaires (toxoplasmose), fongiques (pneumonie à *Pneumocystis*, candidoses, méningite à cryptococcus) et enfin viraux (cytomégalovirus entraînant des rétinites, l'herpès virus 8 entraînant le sarcome de Kaposi, le virus d'Epstein

Barr entraînant des lymphomes, Herpes zoster provoquant des zonas). Finalement, ces maladies entraînent la mort dans la quasi-totalité des cas.

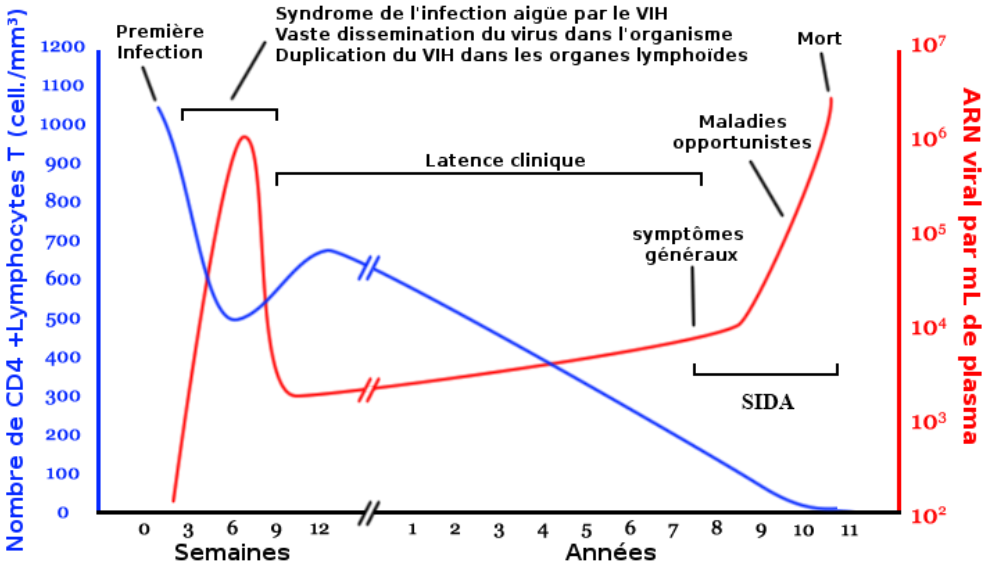


Figure I-3 : Evolution de la charge virale, du taux de lymphocytes CD4 et conséquences cliniques au cours de l'infection par le VIH.

▪ Pandémie mondiale

Depuis le début de la pandémie de SIDA dans les années 1980, plus de 70 millions de personnes ont été infectées dont plus de la moitié sont décédées. Le SIDA continue à tuer 1 à 2 millions de personnes chaque année *(chiffres OMS juillet 2018)*.

L'utilisation de mélanges de médicaments antirétroviraux a permis d'améliorer considérablement le pronostic de l'infection par le VIH. Ils ciblent la reverse transcriptase, la protéase, la fusion et l'intégrase. En réduisant la charge virale dans la plupart des cas à des niveaux indétectables, ils réduisent aussi le risque de transmission. Cependant, ils doivent être pris à vie et ne sont pas dénués d'effets secondaires. Les traitements antiviraux peuvent aussi servir de prophylaxie pré-exposition ou post-exposition pour limiter le risque de contracter le virus, mais leur utilisation est limitée aux situations à risques.

Bien que les traitements antirétroviraux disponibles dans les pays développés assurent une qualité et une espérance de vie presque normales aux personnes infectées, la situation est bien plus préoccupante en Afrique où 25 millions de personnes vivent avec une infection au VIH et où les deux tiers des nouvelles infections se produisent *(chiffres OMS juillet 2018)*. Les mesures préventives et l'accès aux soins, malgré leurs constantes augmentations, ont peu de chance de suffire à enrayer la pandémie. Un vaccin prophylactique serait donc une arme de choix dont la découverte est une priorité de la

recherche depuis l'isolement du virus en 1983. A ce jour, aucun prototype de vaccin n'a permis de protéger de l'infection de façon satisfaisante.

B) La neutralisation du VIH par les anticorps

▪ Premiers essais vaccinaux

Les stratégies vaccinales classiques ayant déjà fait leurs preuves pour de nombreux virus ont d'abord été essayées, mais se sont révélées inefficaces contre le VIH *(Trovato, Int J Mol Sci, 2018).* Par exemple, un prototype de vaccin utilisant un virus simien vivant atténué a été abandonné quand il est apparu que le virus devenait pathogène chez les singes *(Whitney, Curr Opin Infect Dis, 2004).* Les approches basées sur l'inactivation virale se sont également avérées inefficaces *(Kahn, JAMA, 2000).* Il est donc apparu qu'une meilleure compréhension des mécanismes de protection était nécessaire pour mettre au point un vaccin contre le VIH. La plupart des vaccins contre des agents pathogènes bactériens ou viraux induisent des anticorps qui sont prédictifs du niveau de protection *(Plotkin, Clin Infect Dis, 2008)*. Ces anticorps pourraient être seulement le reflet d'une réponse immunitaire efficace, mais il a été montré que le mécanisme de protection de la plupart des vaccins anti-viraux reposait certainement sur la neutralisation. Ces anticorps neutralisants inhibent *in* vitro l'infection des cellules cibles, généralement en bloquant l'entrée du virus. Ainsi, dans le cas du VIH, les anticorps neutralisants reconnaissent les glycoprotéines d'enveloppe, qui sont la seule cible exposée à la surface du virion. Le mécanisme de la neutralisation s'opère par fixation des anticorps aux protéines d'enveloppe et ne fait pas appel à des fonctions effectrices mettant en jeu les fonctions effectrices des anticorps et d'autres composants du système immunitaire. En effet, les anticorps neutralisants inhibent l'infection de cellules permissives à l'infection *in vitro* en l'absence d'autres facteurs comme le complément. La corrélation entre la capacité des anticorps à neutraliser *in vitro* et à protéger contre l'infection par le VIH *in vivo* a été évaluée pour comprendre l'intérêt d'induire ce type de réponse par vaccination.

▪ Intérêt prophylactique des anticorps neutralisants

Les études sur l'intérêt prophylactique des anticorps neutralisants ont rapidement confirmé leur capacité à protéger de l'infection dans les modèles animaux. Ainsi, il a été montré que les anticorps neutralisant le VIH protègent les macaques contre un challenge d'un virus simien chimérique portant une protéine d'enveloppe de VIH (SHIV). Un mélange polyclonal d'immunoglobulines IgG, dirigés contre la protéine d'enveloppe du VIH-1 issus de chimpanzés infectés, a par exemple été administré à des macaques sains, avant un challenge intraveineux de virus SHIV exprimant la même protéine d'enveloppe *(Shibata, Nat Med, 1999).* Ces anticorps polyclonaux protégeaient de l'infection à des concentrations permettant 99% de neutralisation *in vitro* avec un sérum dilué 38 fois *(Nishimura, J Virol, 2002).* Cela signifie que pour atteindre la protection, il fallait que la concentration plasmatique des anticorps soit 38 fois supérieure à leur concentration inhibitrice pour

atteindre 99% de neutralisation (IC99). La nécessité de haute concentration d'anticorps neutralisants pour contrer un challenge intraveineux a été à nouveau soulignée en utilisant un virus à tropisme CCR5, plus représentatif des virus transmis chez l'homme. Un animal sur deux était protégé avec un titre de l'anticorps monoclonal neutralisant b12 de 1/100 *(Parren, J Virol, 2001).* La protection était aussi obtenue avec des inoculations virales par voies muqueuses *(Mascola, Nat Med, 2000)* et ce, à des concentrations d'anticorps moins élevées que reportées précédemment. Ces études utilisaient des doses élevées de virus afin d'infecter tous les animaux contrôle en une seule inoculation. D'autres études chez le macaque ont choisi d'imiter plus fidèlement l'exposition sexuelle chez l'homme en utilisant une faible dose de virus pour des challenges viraux vaginaux ou rectaux répétés. A faible concentration de l'anticorps b12 d'environ 40 µg/mL, le nombre de challenges viraux nécessaire pour produire une infection était largement augmenté, suggérant que les challenges viraux à hautes doses pouvaient sous-estimer la capacité des anticorps à protéger *(Hessell, Nat Med, 2009).* De plus, il a été montré que plus les anticorps monoclonaux neutralisent à des IC50 faibles in vitro, plus ils permettent d'atteindre la protection à des concentrations plasmatiques réduites *(Gautam, Nature, 2016)*. Ainsi, l'anticorps PGT121, qui neutralise *in vitro* à des IC50 de l'ordre de 0,03 µg/mL, assurait 100% de protection stérilisante à une concentration plasmatique de 15 µg/mL *(Moldt, PNAS, 2012).* Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres anticorps neutralisants *(Pegu, Immunol Rev, 2017 ; Shingai, Nature, 2013 ; Shingai, JEM, 2014 ; Saunders, J Virol, 2015 ; Moldt, AIDS, 2016 ; Pegu, Sci Transl Med, 2014 ; Hessell, Nat Med, 2016).*

Ces anticorps neutralisants sont donc efficaces à des concentrations de quelques microgrammes par millilitre, une concentration qui peut être atteinte par vaccination. Finalement, les anticorps entraînent une protection totale, stérilisante, suggérant qu'un immunogène induisant des anticorps neutralisants empêcherait la transmission du virus ou la réplication virale à un stade très précoce, avant l'installation d'un réservoir viral.

- **Problème de la variabilité génétique virale**

Afin d'induire des anticorps dirigés contre la protéine d'enveloppe, des immunogènes ont été développés à partir de différentes constructions de sous-unités gp120 de la protéine d'enveloppe. En essai clinique de phase III, les essais VAX003 et VAX004 consistaient en l'injection de gp120 recombinantes monomériques de sous-types B AIDSVAX®B/B ou de sous-types différents AIDSVAX® B/E à des populations à risque *(Pitisuttithum, J Infect Dis, 2006 ; Flynn, J Infec Dis, 2005)*. Ces immunisations n'ont démontré aucun effet protecteur.

L'échec des essais vaccinaux VAX003 et VAX004 est en partie imputable à l'utilisation de formes monomériques de la gp120 comme nous l'expliquerons plus tard. Cet échec est aussi lié à l'énorme variabilité du VIH. Les anticorps neutralisants induit par les gp120 recombinantes monomériques étaient neutralisants contre certaines souches virales, particulièrement sensibles à la neutralisation, mais ces anticorps n'étaient pas neutralisants

contre la grande diversité de souches circulantes dans le monde et ne permettaient donc pas de prévenir l'infection par ces virus. Ainsi, la variabilité génétique du VIH est extrême. Elle est principalement due à la reverse transcriptase qui est sujette à erreur et produit environ 5 x 10^{-5} mutations par nucléotide par cycle réplicatif. Un deuxième facteur de variabilité génétique est la recombinaison des génomes de virus infectant la même cellule. Enfin, la rapidité et la quantité de la réplication virale permettent une rapide diversification intra-hôte et inter-hôte *(Ho, Nature, 1995)*.

Pendant longtemps, s'est donc posé la question de savoir si des anticorps pouvaient neutraliser efficacement la diversité des souches du VIH. Finalement, au début des années 2000, il a été montré que chez une fraction des personnes infectées, la stimulation antigénique prolongée pouvait faire apparaître une réponse neutralisante à large spectre, c'est-à-dire capable de neutraliser des souches virales très diverses de différents sous-types. Certains anticorps monoclonaux, issus de ces personnes infectées, sont capables de neutraliser près de 100% des virus circulants. Ces anticorps neutralisants à large spectre suscitent les meilleurs espoirs pour un vaccin prophylactique puisqu'ils empêcheraient l'infection par la majeure partie des souches de VIH circulantes dans le monde *(Burton, Annu Rev Immunol, 2016)*.

A la suite des essais VAX003 et VAX004, afin d'associer les réponses humorales et les réponses cellulaires de l'immunité adaptative, un nouvel essai clinique, RV144, a été mené. Un vecteur canarypox exprimant gag et pro de sous-type B et une gp120 de sous-type AE liée à la partie transmembranaire de gp41 ont été utilisé en quatre injections complétées d'injections rappels de AIDSVAX® B/E. Les données statistiques indiquant une protection dans cet essai sont controversées *(Desrosiers, J Virol, 2017)*, mais affichaient 60 % de protection à 12 mois pour chuter à 31% à 3,5 ans. La recherche des corrélats de protection dans cet essai a montré une insuffisance des réponses neutralisantes et des réponses cellulaires. En revanche, les personnes non infectées avaient de plus fort taux d'anticorps non-neutralisants à activité cytotoxique à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et provoquant l'activation du complément *(Haynes, N Engl J Med, 2012 ; Zolla-Pazner, Plos One, 2013 ; Liao, Immunity, 2013)* suggérant un rôle potentiel des fonctions effectrices des anticorps dans la protection vaccinale. Bien que de nombreuses investigations sur le potentiel des fonctions effectrices des anticorps dans la protection vaccinale sont en cours, nos travaux se concentrent sur les réponses à anticorps neutralisants. En effet, la neutralisation apparaît comme une propriété essentielle, la seule pour laquelle une corrélation avec la protection a été démontrée. De plus, la capacité des anticorps à neutraliser à large spectre correspond à leur capacité à se fixer sur la grande majorité des protéines d'enveloppe des virus circulants, ce qui permettrait éventuellement de bénéficier de leurs fonctions effectrices de manière également large spectre.

Dans la suite de cette introduction, nous décrirons d'abord la glycoprotéine d'enveloppe, la seule cible des anticorps neutralisant le VIH. Puis, nous expliquerons les

mécanismes canoniques de la réponse humorale qui entrent en jeu dans l'apparition de la neutralisation hétérologue à large spectre. Nous verrons ensuite pourquoi ce type de réponses concerne essentiellement certaines personnes infectées au long cours et les contraintes qui s'appliquent à leur développement, tant dans l'infection naturelle que dans une perspective vaccinale. Nous finirons en détaillant le cas des anticorps ciblant la région riche en mannose sur la gp120, la plus fréquemment ciblée par les réponses neutralisantes à large spectre et à laquelle nos travaux se sont intéressés en particulier.

C) La structure du trimère d'enveloppe

La glycoprotéine d'enveloppe est la seule protéine virale exprimée à la surface des virions, et en conséquence la seule cible des anticorps neutralisants. La protéine d'enveloppe est un hétérotrimère de trois sous-unités gp120 et trois sous-unités gp41 liées entre elles par des liaisons non covalentes (Figure I-4). Le gène *env* est d'abord traduit en un polypeptide gp160 d'environ 850 acides aminés qui se replie en trimère ancré à la membrane lipidique du réticulum endoplasmique. Puis le trimère est transporté dans l'appareil de Golgi pour être clivé par la protéase cellulaire Furine en sous-unités gp120 et gp41. La zone de clivage comprend deux sites qui doivent être tous les deux clivés pour produire un trimère fonctionnel *(Crooks, J Virol, 2011)*.

La gp41 est transmembranaire et assure l'ancrage à la membrane lipidique par le peptide signal. Sa partie C-terminale d'environ 150 résidus est intracellulaire. L'ectodomaine comprend des séquences impliquées dans la fusion des membranes virale et cellulaire. Immédiatement en aval du site de clivage avec la gp120, une séquence d'une trentaine d'acides aminés hydrophobes est appelée peptide de fusion. La gp41 contient aussi deux domaines hélicoïdaux de répétitions heptade HR1 et HR2. Précédant le domaine transmembranaire, l'ectodomaine se termine par la région MPER (région externe proximale de la membrane). Dans la structure du trimère, la gp41 encercle les extrémités N-terminale et C-terminale de la gp120 *(Burton, Annu Rev Immunol, 2016)*.

La gp120 contient cinq régions hypervariables et cinq régions constantes s'alternant dans l'ordre suivant : C1, V1, V2, C2, V3, C3, V4, C4, V5, C5. Les régions variables s'organisent en boucles à la surface de la protéine d'enveloppe. Leurs extrémités sont maintenues au cœur de la protéine par des ponts disulfures très conservés. Les boucles V1 et V2 forment l'apex du trimère et la boucle V3 est en partie séquestrée sous les boucles V1 et V2. On peut distinguer sur la gp120 un domaine interne et un domaine externe connectés par un feuillet bêta antiparallèle de quatre brins. Le domaine externe est plus variable et glycosylé que le domaine interne qui s'engage dans les interactions entre protomères et avec la gp41.

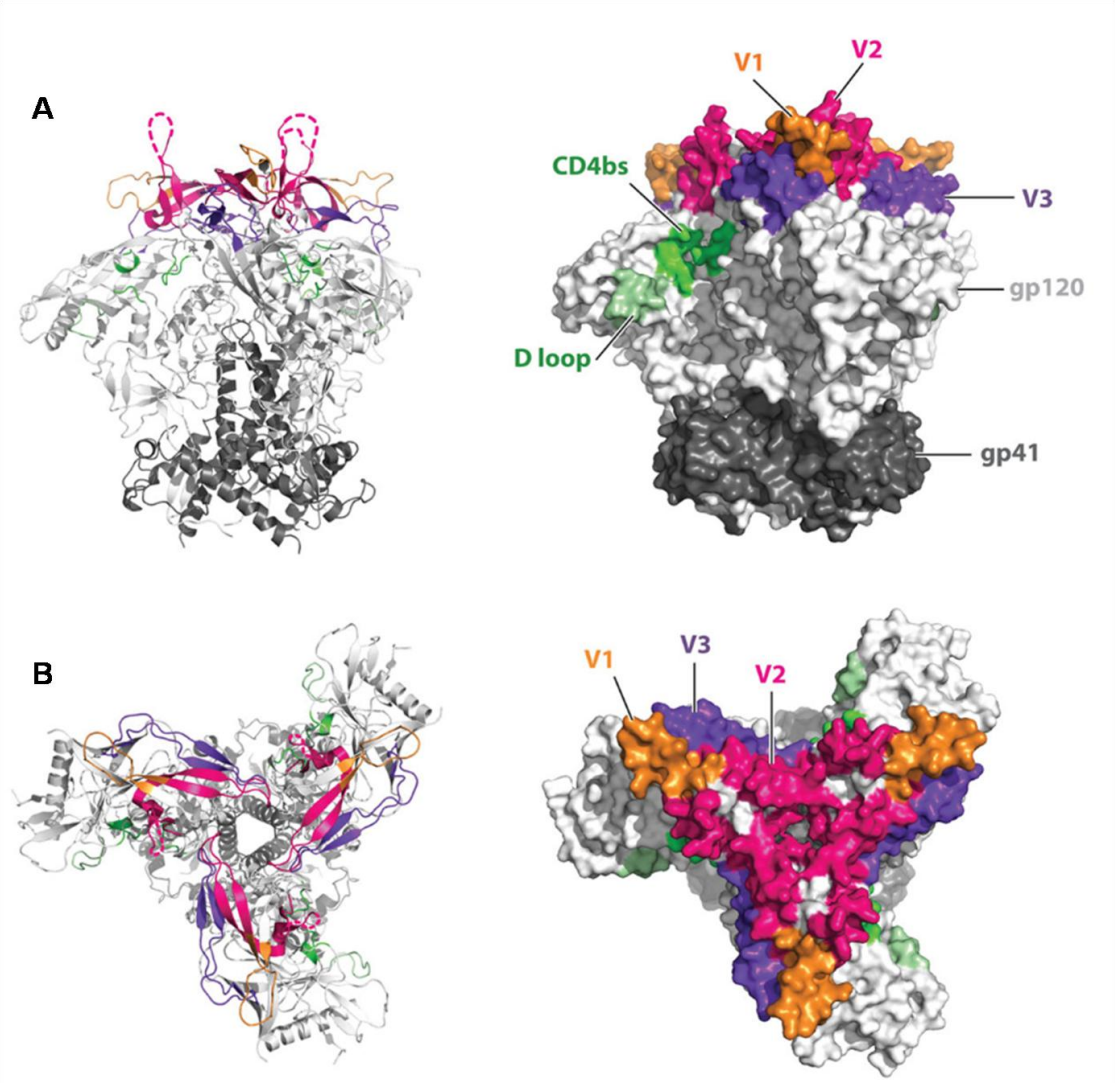


Figure I-4 : Structure cristallographique du trimère d'enveloppe soluble SOSIP BG505.664, résolue par Do Kwon, Nat Struc mol biol, 2015, PDB 4ZMJ, et illustrée par Burton, Annu rev immunol, 2016. A) Vue de côté B) Vue du dessus. Les glycosylations sont absentes de cette représentation.

- **Fusion membranaire**

Le trimère d'enveloppe permet la fusion de la membrane virale et de la membrane de la cellule hôte *(Carnec, Virologie, 2007)*. Cette fusion débute par l'attachement de la gp120 sur le récepteur CD4 qui entraîne des changements conformationnels importants. Ainsi, la structure non liée du trimère est fermée et se distingue de la structure liée au CD4, ouverte à son sommet. Le cœur de la protéine formé par un feuillet bêta est réorganisé, les boucles V1 et V2 s'écartent de l'apex de la protéine d'enveloppe et la boucle V3 devient exposée. Dans cette conformation, le trimère expose ses sites de fixation aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 *(Guttman, Structure, 2014)*.

Après la liaison à l'un ou l'autre des corécepteurs, le trimère subit de nouveaux changements conformationnels qui exposent le peptide de fusion. Celui-ci s'insère dans la membrane de la cellule hôte. Les deux répétitions heptade de la gp41 s'assemblent en un paquet de six hélices alpha compactes qui rapproche les membranes de la cellule hôte et du virus et permet la fusion.

Hormis le récepteur et les corécepteurs, d'autres constituants de la surface des cellules cibles peuvent jouer un rôle dans la capture du virion. Les héparanes sulfates chargés négativement fixent des résidus basiques de la surface de la gp120 *(Roderiquez, J Virol, 1995)*. La lectine DC-SIGN, à la surface des cellules dendritiques, se lie avec une haute affinité à la protéine d'enveloppe et facilite l'entrée virale. Elle est aussi capable de présenter le virion aux lymphocytes T pour les infecter *(Burleigh, J Virol, 2006)*.

- **Diversité génétique de la protéine d'enveloppe**

Par convention, les séquences virales sont numérotées par alignement à la souche virale de référence de sous-type B HXB2, séquencée en totalité en 1985 *(Ratner, Nature, 1985)*. Les séquences de protéines d'enveloppe varient considérablement d'un individu à l'autre et au sein d'un même individu. La diversité est contrainte par le coût sur le fitness réplicatif et la pression de sélection exercée par le système immunitaire. La fréquence des mutations est probablement égale sur toute la longueur du génome, mais les mutations délétères ne se retrouvent pas dans la population de virus réplicatifs.

- **Nombre de trimères sur le virion**

Les trimères sont au nombre de 8 à 10 par virion *(Zhu, PNAS, 2003 ; Zanetti, Plos Pathog, 2006 ; Zhu, Nature, 2006)* ce qui est très peu en comparaison d'autres virus comme le virus de la grippe. Le nombre de trimères engagés avec les récepteurs et corécepteurs nécessaire pour permettre l'entrée virale pourrait être de 1 à 3 trimères *(Brandenberg, Plos Pathog, 2015).*

- **Protéines d'enveloppe non fonctionnelles**

De nombreuses formes non fonctionnelles de la protéine d'enveloppe peuvent exister à la surface des virus ou en solution comme des monomères de gp120 exposant des parties cachées dans le trimère, des trimères de gp41 ancrés à la membrane lipidique sans gp120 associées ou encore des trimères non clivés *(Poignard, J Virol, 2003 ; Moore, J Virol, 2006).* Plutôt que de résulter de la dégradation de la protéine d'enveloppe à la surface du virus, les formes non fonctionnelles seraient nombreuses à être exportées du réticulum endoplasmique et incorporées au virion *(Crooks, J Virol, 2011).*

Dans l'infection par le VIH, le système immunitaire est mis en présence de cette diversité de formes fonctionnelles et non fonctionnelles. Les lymphocytes B, qui sont sélectionnés sur la base de l'affinité et non de la neutralisation, peuvent produire des anticorps qui reconnaissent des formes non fonctionnelles. Ceux-ci ne parviennent généralement pas à neutraliser les virus, car les épitopes reconnus ne sont pas présents sur la protéine d'enveloppe fonctionnelle. De plus, comme nous le préciserons plus tard, les constructions monomériques de la protéine d'enveloppe ne parviennent pas à produire une réponse neutralisante à larfe spectre, probablement en raison de l'immunodominance de régions non-exposées sur le trimère natif. Ainsi, il a été montré que seuls les anticorps capables de se fixer aux trimères natifs fonctionnels sont neutralisants. L'immunisation avec des trimères solubles adoptant une structure proche de l'enveloppe native pourrait donc avoir plus de chance d'induire ces anticorps. L'obtention de trimères solubles à donc monopolisé de nombreux efforts.

- **Trimères solubles**

Plusieurs types de trimères solubles ont été mis au point. Le plus répandu est certainement le trimère soluble SOSIP. La construction du trimère soluble SOSIP est la suivante : introduction d'un pont disulfure entre les cystéines 501 et 605 reliant la gp120 et la gp41, amélioration de l'efficacité du clivage par la Furine par modification du site de clivage RXXR par 6 arginines, mutation I559P stabilisant les sous-unités gp41 et la conformation pré-fusion, et mutation non-sens tronquant la protéine au résidu 664 pour supprimer la région MPER favorisant l'agrégation. La première construction SOSIP, issue de la souche virale de sous-type A BG505, contient aussi une mutation T332N introduisant le glycane à cette position qui est absent dans la protéine d'enveloppe sauvage *(Sanders, Plos Pathog, 2013)*. La structure de ce SOSIP BG505.664 a été obtenue à haute résolution pour la première fois en 2013 *(Julien, Science, 2013)*. Des constructions SOSIP issues de virus de différents sous-types ont aussi été obtenues *(Julien, PNAS, 2015)*. D'autres constructions produisant des trimères solubles natifs ont été développées. Le trimère NFL (Native Flexibly Linked) contient une courte séquence liant les sous-unités gp120 et gp41 sans nécessité de clivage par la Furine *(Sharma, Cell Rep, 2015 ; Guenaga, J Virol, 2015)*. Le trimère UFO (Uncleaved prefusion-optimised) contient également une séquence liante à la place du site de clivage et un domaine de répétition heptade HR1 stabilisé améliorant le rendement de production *(Kong, Nat Commun, 2016)*. Les propriétés antigéniques et structurales de ces constructions sont proches de la protéine d'enveloppe native et fonctionnelles *(Sanders, Immunol Rev, 2017).* En effet, ces trimères sont liés par des anticorps neutralisants, mais pas par des anticorps non neutralisants, car les épitopes de ces derniers sont cachés dans la structure, ce qui suggère une conformation native et pourrait être favorable à une approche vaccinale cherchant à induire des anticorps neutralisant.

D) Les glycanes du trimère d'enveloppe

L'obtention de constructions solubles du trimère a permis une meilleure compréhension de sa structure, mais aussi de son contenu en sucres. Très abondants sur cette glycoprotéine, les sucres représentent la moitié de la masse du trimère et font partie de l'épitope de nombreux anticorps neutralisants à large spectre comme nous le montrerons dans la partie consacrée à la neutralisation hétérologue à large spectre. La comparaison de la composition en sucres des protéines d'enveloppe natives du virus et des différentes constructions de monomères ou trimères solubles est essentielle pour valider un immunogène candidat.

▪ Voies de synthèses des glycanes

Les nombreux sucres de la protéine d'enveloppe se présentent à sa surface en une couverture dense cachant la plupart des résidus protéiques sous-jacents. La gp120 possède 8 sites de O-glycosylation sur résidus sérine ou thréonine et entre 18 et 33 sites de N-glycosylation potentiels *(Reynard, Virologie, 2006)*. La modification post-traductionnelle par N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique par le transfert d'un précurseur $GlcNac_2Man_9Glc_3$ sur un résidu asparagine de la protéine inclus dans une séquence consensus N-X-S/T-X ou X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline (Figure I-5). Le précurseur est immédiatement élagué des trois résidus glucose sur la branche D1 par les glucosidases I et II et d'un ou deux mannoses par une endomannosidase donnant un mélange de $Man_9GlcNac_2$ et de $Man_8GlcNac_2$. La protéine une fois correctement repliée est transportée à l'appareil de Golgi et subit un nouvel élagage des résidus mannose par la mannosidase I. Ensuite, un résidu GlcNac est ajouté sur une des branches par la N-acétylglucosaminyltransferase I (GnTI). Finalement, selon l'accessibilité du site aux différentes enzymes de l'appareil de Golgi, des résidus sucrés comme le N-acétylglucosamine, le galactose, le fucose et l'acide sialique sont ajoutés à des degrés divers et avec plus ou moins de branchements.

On peut distinguer les sucres hautement mannosylés relativement simples contenant 5 à 9 résidus mannose, les sucres hybrides ramifiés et contenant également des mannoses, et enfin les sucres complexes contenant entre 2 et 4 branchements et des résidus d'acide sialique. De nombreux facteurs influencent la nature des sucres finalement présents sur la glycoprotéine. Les acides aminés environnant le site de N-glycosylation, le repliement adopté par le polypeptide dès la sortie du ribosome, puis la structure tertiaire modulent le rendement des réactions de N-glycosylation et créent une hétérogénéité dans le nombre et la nature des sucres présents sur chaque site. Le type cellulaire et son activité biologique à chaque instant ont également une grande importance puisqu'ils influent sur la quantité de chaque type de monosaccharides et l'expression des nombreuses enzymes impliquées.

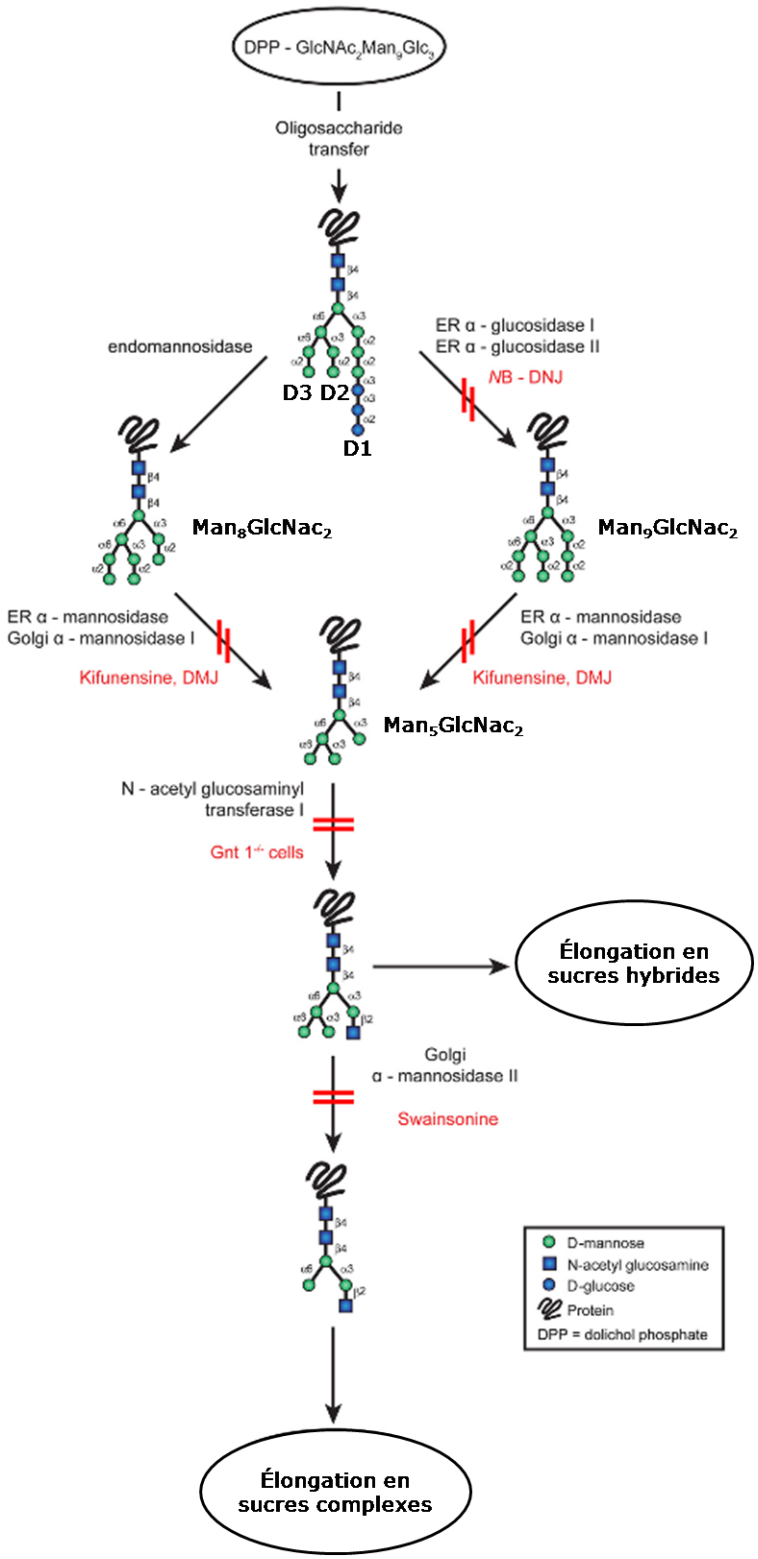


Figure I-5 Voies de synthèse des glycanes. Les inhibiteurs de glycosidases sont indiqués en rouge sous les enzymes qu'ils inhibent, adapté de Doores, J Virol, 2010

▪ Nature des glycanes du trimère d'enveloppe

La plupart des sucres à la surface de la protéine d'enveloppe sont des oligomannoses et plus du tiers sont des $Man_8GlcNac_2$ ou $Man_9GlcNac_2$ *(Pritchard, Cell Rep, 2015).* Le reste des sucres dont la plupart sont contenus sur la gp41 sont des sucres complexes bi, tri et tetra-anténnés terminant majoritairement par un galactose *(Pritchard, J Virol, 2015).*

La densité de glycanes plus importante sur la gp120 que sur la gp41, ainsi que la structure très compacte du repliement, réduisent l'accès des enzymes aux sucres et bloquent leurs élongations. En effet, l'incubation prolongée avec l'alpha mannosidase I de l'appareil de Golgi ne permet pas de retirer tous les résidus mannose nécessaire à la poursuite de la synthèse en sucres hybrides et complexes *(Doores, PNAS, 2010).* Ceci explique l'abondance des sucres hautement mannosylés contenant entre 5 et 9 résidus mannose sur la gp120. Ces sucres se concentrent dans la région autour de la base de la boucle V3, appelée patch intrinsèquement riche en mannose. Le glycane au centre de ce patch est le glycane porté par le résidu N332.

▪ Techniques pour la détermination de la nature des sucres

Les inhibiteurs des voies de synthèses des sucres sont largement utilisés pour déterminer la composition des sucres et faciliter la cristallogenèse ou la reconstruction tridimensionnelle à partir de clichés de microscopie électronique (Figure I-5) *(Doores, J Virol, 2010)*. La NB-DNJ inhibe le clivage des résidus glucose terminaux du précurseur. La kifunensine inhibe la mannosidase I et résulte en une concentration en sucre à 8 ou 9 mannoses non branchés. L'enzyme GnTI est génétiquement délétée dans la lignée cellulaire HEK293S qui permet donc de produire des protéines sans glycanes hybrides et complexes et enrichies en $Man_5GlcNac_2$. L'alcaloïde swainsonine inhibe l'action de la mannosidase II et bloque la processivité de $Man_5GlcNac_3$ en sucres complexes. Les sucres peuvent cependant être modifiés en sucres hybrides. Les protéines peuvent aussi être déglycosylées une fois purifiées. L'EndoH clive les glycanes riches en mannose et hybrides, mais pas les glycanes complexes. Elle clive après le deuxième GlcNac à la base du glycane. La PNGase F clive tous les glycanes au niveau de leur liaison covalente avec le résidu asparagine. Si le traitement avec l'enzyme est opéré après liaison avec un anticorps, on peut observer une protection des glycanes entrant en interaction avec l'anticorps.

L'étude structurale des glycoprotéines par cristallographie aux rayons X ou cryomicroscopie électronique se heurte à des obstacles. Les sucres adoptent des structures souvent très flexibles dont la densité électronique est souvent insuffisante pour la reconstruction des résidus sucrés, particulièrement pour ceux qui sont éloignés de la surface protéique. De plus, la nature d'un glycane à une même position d'une préparation protéique est hétérogène et compromet aussi la reconstruction. Enfin, de par leur nature flexible et hétérogène, les glycanes sont un frein à la nucléation et la cristallogenèse. Cependant, dans

la structure de complexes entre une protéine d'enveloppe et un anticorps, les glycanes au cœur de l'interaction sont généralement suffisamment stabilisés pour permettre leurs reconstructions.

Récemment, la spectrométrie de masse a fait ses preuves pour la détermination de la composition globale en sucres portés par une glycoprotéine *(Behrens, Expert Rev Proteomics, 2017)*. La glycoprotéine est d'abord complètement déglycosylée et les sucres sont marqués avec des fluorophores puis séparés par chromatographie très haute performance. Ils peuvent être identifiés avec précision par spectrométrie de masse suivant plusieurs techniques d'ionisation et de séparation qui ont chacune leurs avantages et inconvénients. Plus récemment, la nature du glycane à chaque position de N-glycosylation a aussi été étudiée. Pour ce faire, la glycoprotéine doit être clivée en glycopeptides qui sont analysés là encore par différentes techniques de spectrométrie de masse.

- **Glycanes des différentes constructions de protéine d'enveloppe**

La composition en sucres de différentes constructions de protéine d'enveloppe exprimées dans plusieurs lignées cellulaires a fait l'objet de nombreuses études, afin notamment de valider la similarité des immunogènes candidats avec la protéine native portée par le virion. Les différences observées sont généralement peu significatives et confortent l'idée que les constructions trimériques expriment des protéines d'enveloppe très proches de la protéine d'enveloppe native. Par ailleurs, la gp120 recombinante produite en cellules HEK293T porte des oligomannoses et des sucres complexes très similaires à la gp120 extraite de virions réplicatifs produits en cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ou de pseudovirus fonctionnels produits en HEK293T *(Pritchard, J Virol, 2015).*

- **Glycanes à chaque position**

Bien que l'hétérogénéité des glycanes soit importante sur un même site, des tendances générales ont pu être observées sur les sites de glycosylations de la protéine d'enveloppe du VIH. Ainsi, il y a une proportion habituelle de glycanes riches en mannose, hybrides ou complexes pour une position donnée d'une souche de VIH (Figure I-6). Les études par spectrométrie de masse sur le SOSIP BG505 donnent un résultat très précis de la composition des glycanes de chaque site *(Cao, Nature Commun, 2017 ; Behrens, Cell Rep, 2016).* Ainsi, les glycanes N156, N234, N262, N295, N332, N339, N363, N386, N392 et N448 sont occupés en majeur partie par un oligomannose à 9 mannoses. Notamment, N295, N332, N339, N386, N392 et N448 ont moins de 30% de glycanes à 8 mannoses et l'essentiel des glycanes ont 9 mannoses. N332 est le glycane le plus riche en Man_9 avec près de 90% d'occupation. Cette structure montre également que des regroupements de glycanes stabilisent leurs conformations. Ainsi, les glycanes N262, N448, N332 et N301 se regroupent autour du glycane N295 tandis que les glycanes N363, N386 et N392 sont groupés ensemble.

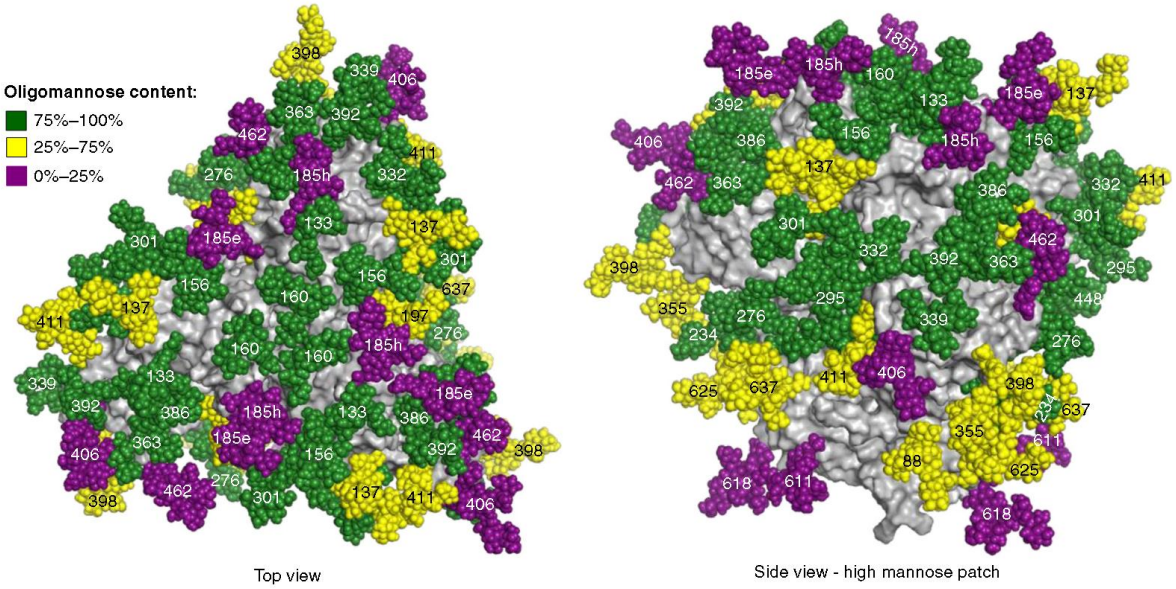


Figure I-6 : Cartographie du contenu en oligomannose à chaque site de glycosylation sur la structure du trimère soluble BG505 SOSIP.664. La structure du trimère en gris est issue de PDB 4TVP, vue du dessus (gauche) et vue de côté centrée sur la région riche en mannose (droite), adapté de Cao, Nature commun, 2017.

L'étude de la spécificité des anticorps neutralisants fait souvent appel à des mutants de protéine d'enveloppe abolissant un site potentiel de N-glycosylation. Plutôt que de simplement supprimer un glycane, ces mutations résultent en une redistribution du contenu des sucres avoisinants *(Pritchard, Nat Commun, 2015)*. Par exemple, la mutation N295A ne diminue pas de façon détectable le contenu en oligomannoses de l'ensemble du patch, mais diminue très spécifiquement la proportion d'oligomannose $Man_9GlcNac_2$ au profit d'oligomannose entre 6 et 8 résidus mannose dans les sucres avoisinant. Le glycane N332 semble être exclusivement constitué de 8 ou 9 résidus mannoses à 35 et 65% respectivement. L'absence d'un glycane environnant supprimé par mutation (N301A, N295A, N339A, N392A, N448A) résulte en l'augmentation de la proportion de sucres à 8 mannoses par rapport à 9 mannoses en N332. La mutation N295A notamment, convertit presque tous les sucres du glycane N332 en Man_8.

- **Système immunitaire face aux glycanes**

Les glycanes produits par les cellules humaines ne sont normalement pas reconnus par le système immunitaire puisque cela constituerait une autoimmunité. L'abondance de sucres d'origine humaine à la surface du VIH a donc longtemps été considérée comme un bouclier, protégeant la protéine de la reconnaissance par le système immunitaire. De plus, les sucres sont généralement liés avec une faible affinité de par une contribution entropique défavorable due principalement à la flexibilité des glycanes *(Haji-Ghassemi, Glycobiology,*

2015). Cependant, dans le contexte du VIH, la concentration d'oligomannoses sur la gp120 la distingue des protéines humaines. Ainsi, le patch intrinsèquement riche en mannose peut être reconnu comme un antigène étranger. Par ailleurs, comme nous le verrons, la plupart des anticorps neutralisants à large spectre incorporent des glycanes de la protéine d'enveloppe dans leurs épitopes.

Partie 2) La réponse humorale aux infections

Suivant une infection ou une immunisation, la réponse immunitaire adaptative se met en place. Elle fait appel à des cellules hautement spécialisées de la famille des globules blancs, les lymphocytes de type B et T. Les lymphocytes T CD8 assurent l'activité cytotoxique tandis que les lymphocytes T CD4 auxiliaires jouent un rôle primordial dans la coopération des cellules immunitaires qui permet une réponse efficace. Nous nous intéresserons essentiellement aux lymphocytes B responsables de la réponse humorale par production d'immunoglobulines (Ig), les anticorps.

Les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse, un organe lymphoïde primaire, par différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Une personne en bonne santé possède plusieurs milliards de lymphocytes B par litre de sang. Chacun possède une spécificité unique et la capacité d'être activé lorsque son anticorps de surface se lie à un motif moléculaire unique. Ainsi, la diversité du répertoire de lymphocytes B permet la réponse humorale contre virtuellement n'importe quel élément moléculaire étranger. Celui-ci se définit comme un antigène, c'est-à-dire une molécule capable d'initier une réponse immunitaire. Il peut provenir d'un pathogène bactérien, fongique, parasitaire, viral ou être n'importe quel corps étranger pénétrant dans l'organisme, notamment par immunisation. La spécificité du lymphocyte B repose sur son anticorps qui se présente sous la forme de BCR (récepteur de lymphocyte B) ancré à la membrane cellulaire ou sous forme de protéines solubles circulantes dans le sang et les tissus. Le nom de réponse humorale provient de cette capacité à circuler dans l'humeur, c'est-à-dire le sang.

A) Les immunoglobulines et leurs gènes

▪ Protéine d'immunoglobuline

Les anticorps sont composés de quatre chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes et adoptant une structure en Y *(Edelman, Scand J Immunol, 1991 ; Schroeder, J Allergy Clin Immunol, 2010).* Chaque anticorps comprend deux chaînes lourdes identiques d'environ 50 kDa (abrévié HC pour Heavy Chain) et de deux chaînes légères identiques d'environ 25 kDa. La chaîne légère est soit une chaîne kappa (KC) soit une chaîne lambda (LC). Chez l'humain, la chaîne kappa est environ deux fois plus fréquente que la chaîne lambda. Les chaînes lourdes et légères sont composées de plusieurs domaines protéiques d'environ 110 acides aminés adoptant un repliement similaire en feuillets bêtas antiparallèles dans une structure appelée clé grecque. La chaîne légère

possède un domaine variable et un domaine constant et la chaîne lourde possède un domaine variable et trois domaines constants.

Les deux domaines constants des deux chaînes lourdes formant la base du Y constituent le fragment cristallisable Fc qui est différent pour chaque isotype d'anticorps *(Porter, Scand J Immunol, 1991).* Ainsi, les anticorps IgM, IgD, IgA, IgE et IgG se distinguent par leurs régions Fc qui leur confèrent des différences dans leurs degrés d'oligomérisation, leurs répartitions dans le corps et les fonctions effectrices qu'ils assurent telles que la fixation du complément ou la fixation à un récepteur Fc. L'isotype IgG est le plus abondant dans les tissus et dans la circulation sanguine avec une dizaine de grammes par litre. Sa demi-vie est d'une vingtaine de jours.

Les autres domaines protéiques de l'anticorps forment les deux branches supérieures du Y, une région que l'on appellera l'apex. Ils constituent deux fragments Fab (fragment antigene binding) identiques responsable de la liaison à l'antigène de façon divalente. En effet, chaque anticorps IgG peut potentiellement se lier à deux exemplaires identiques de l'antigène, reconnu avec la même spécificité. L'interaction de l'anticorps avec l'antigène peut être médiée par toutes sortes de forces électrostatiques comme les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les forces hydrophobes et les forces de Van der Waals *(Braden, Immunol Rev, 1998)*. La surface de l'anticorps entrant en contact avec l'antigène est le paratope. La surface de l'antigène reconnu est l'épitope.

Les séquences des domaines variables sont subdivisées en une alternance de séquences relativement constantes génétiquement et de séquences plus variables *(Padlan, Mol Immunol, 1994)*. Les premières sont au nombre de quatre et sont des régions cadres ou charpentes appelées « framework » (FR) en anglais. Elles assurent le repliement global de la région variable. Les régions de plus grandes variabilités sont au nombre de 3 appelées « complementary determining regions » (CDR) car elles sont responsables de la complémentarité entre l'anticorps et l'antigène. Ces dernières adoptent le plus généralement un repliement en boucles à l'apex de l'anticorps. Ainsi, la chaîne lourde est composée par l'ordre suivant de ces séquences en partant de l'extrémité N-terminale : FRH1, CDRH1, FRH2, CDRH2, FRH3, CDRH3, FRH4. Ici, la lettre H permet de préciser que l'on parle de la chaîne lourde. Pour la chaîne légère, l'ordre des séquences est le même et on remplacera la lettre H par la lettre L.

▪ Organisation des gènes d'immunoglobuline

La diversité de spécificité des lymphocytes provient de l'organisation unique de ses gènes d'anticorps et d'un mécanisme de réorganisation se produisant pendant la maturation des cellules appelés recombinaison VDJ (Figure I-7) *(Weigert, Nature, 1980)*.

Les gènes de chaînes lourdes et légères kappa et lambda sont sur des loci différents sur les chromosomes 14, 2 et 22 respectivement. Chaque chaîne est encodée par plusieurs

types de segments de gènes appelés Variable V, Jointure J et Constant C. La chaîne lourde comprend en plus des segments Déterminant D. Ces segments sont séparés de régions non codantes éliminées au moment de la recombinaison somatique VDJ ou de l'épissage de l'ARN messager. Chaque segment de gènes est présent en plusieurs copies génétiquement uniques *(Matsuda, Adv Immunol, 1996)*.

Ainsi, il y a environ 80 copies du gène VH sur le locus du gène de chaîne lourde sur le chromosome 14. Environ la moitié seulement permet la production d'une immunoglobuline fonctionnelle. Les autres sont des pseudogènes. En aval des segments VH, il y a 27 copies du segment DH et 6 copies du segment JH. Enfin, il y a 9 copies du segment CH correspondant aux différents isotypes d'immunoglobuline. Nous ne préciserons pas ici le rôle de chacun et parlerons toujours des immunoglobulines IgG codées par Cγ. Les loci de chaînes légères kappa et lambda contiennent aussi une multiplicité de copies de segment V, J et C.

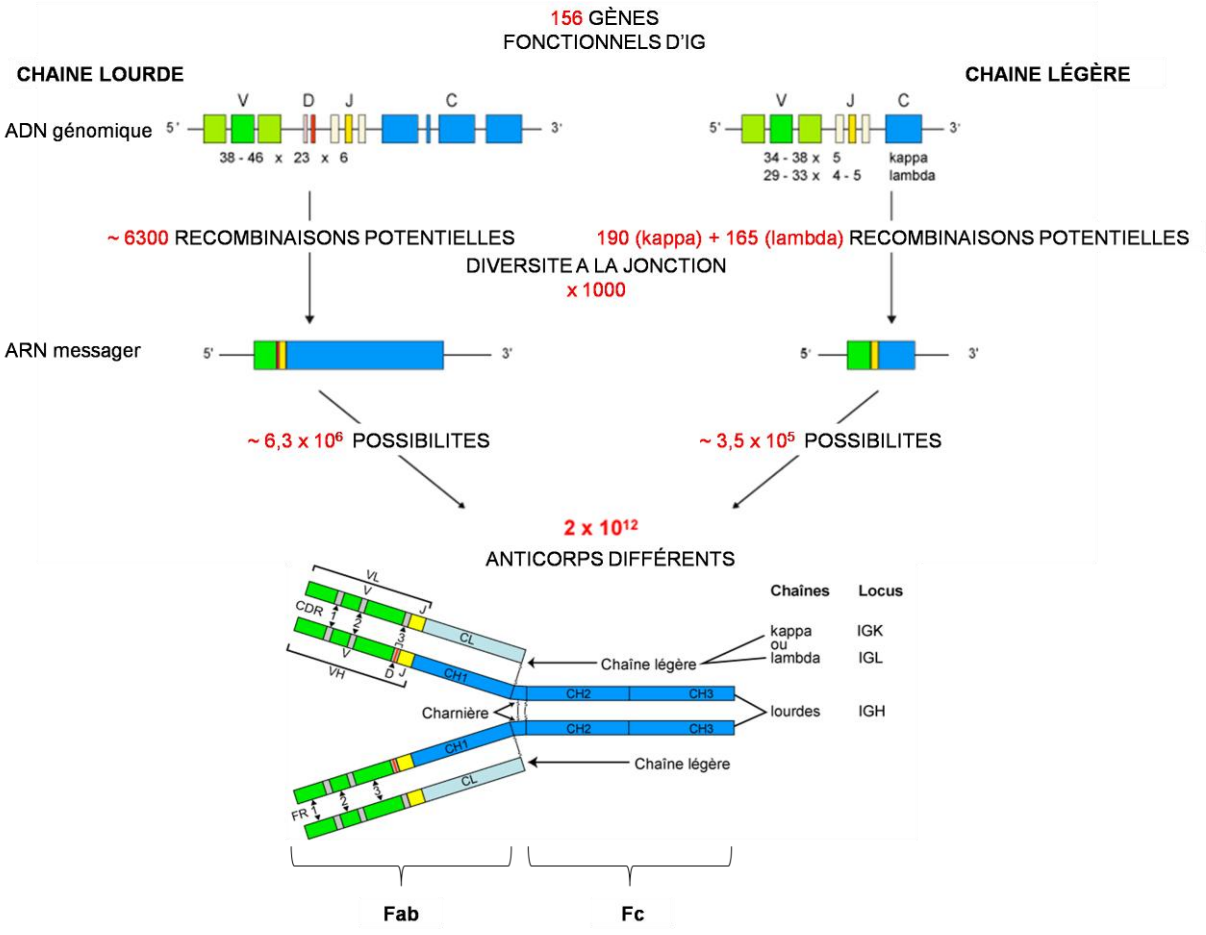


Figure I-7 : Organisation des gènes et de la protéine d'immunoglobuline humaine. L'origine de la diversité génétique est indiquée en rouge. Adapté de IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® http://www.imgt.org (founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France).

▪ Recombinaison VDJ

La production des chaînes d'immunoglobuline fonctionnelles implique le réarrangement irréversible des segments de gènes de l'ADN génomique *(Tonegawa, Nature, 1983).* Ce processus appelé recombinaison somatique VDJ ne se produit que dans les lymphocytes B et T au cours de leur maturation dans les organes lymphoïdes primaires, la moelle osseuse et le thymus respectivement. Pour l'obtention d'un gène réarrangé de chaîne lourde, un exemplaire de chacun des segments V, D, J et C parmi les nombreuses copies disponibles subissent la recombinaison somatique. La chaîne légère, qu'elle soit kappa ou lambda, est obtenue de façon similaire, mais n'implique pas de segment D.

Chaque segment de gène V et J comprend une séquence signal de recombinaison (SSR) à son extrémité 3' et 5' respectivement et le gène DH en contient une de part et d'autre *(Fugmann, Annu Rev Immunol, 2000).* Ces séquences SSR sont composées d'un heptamère et d'un nonamère de bases nucléotidiques très conservés entre individus et séparés d'une petite séquence plus variable de 12 ou 23 bases. La recombinaison se produit en trois étapes : l'hybridation des SSR, la coupure à ces deux positions et la religation. Ces différentes étapes font intervenir les protéines RAG-1 et RAG-2 spécialement exprimées dans les lymphocytes et le système ubiquitaire de réparation de l'ADN lésé.

Pour la chaîne lourde, la recombinaison commence entre un segment D et un segment J. Puis une seconde recombinaison appose un segment V en extrémité N-terminale du recombinant DJ. Pour la chaîne légère, un segment V et J sont recombinés. Pour les deux chaînes, le segment C est ensuite rapproché par excision d'un intron au moment de l'épissage de l'ARN messager. Le segment C de la chaîne lourde qui définit l'isotype de l'immunoglobuline est sélectionné à ce moment-là par un épissage alternatif. Au terme de la recombinaison somatique, le segment V code pour l'essentiel du domaine variable, de la région FR1 au début de la région CDR3. Sur la chaîne lourde, le reste de la boucle CDRH3 est à cheval sur les segments V, D et J. Le reste du segment J code pour le FR4.

Suivant la recombinaison VDJ, une seconde recombinaison peut se produire dans le gène de chaîne lourde ou légère, notamment si la première recombinaison a produit un gène non fonctionnel ou un lymphocyte B autoréactif. La fréquence de ces évènements pourrait être augmentée chez les personnes souffrant de maladies autoimmunes et chez les personnes infectées par le VIH. Le remplacement de séquence variable peut même se produire plusieurs fois. Ce mécanisme est à l'origine des longues boucles CDRH3 de certains anticorps ciblant le VIH *(Liao, Clin Immunol, 2013).*

▪ Diversité du répertoire de lymphocytes B naïfs

La diversité du répertoire de lymphocytes B naïfs provient d'abord de la combinaison aléatoire de chacun des segments de gènes parmi les nombreuses copies du génome et de la

combinaison d'une chaîne lourde unique avec une chaîne légère unique. Cette diversité avoisine 10^6 combinaisons (Figure I-7).

De plus, la jonction à chaque étape de recombinaison est imprécise *(Gauss, Mol Cell Biol, 1996)*. Des nucléotides peuvent être ajoutés ou supprimés au niveau de chacune des jonctions entre les segments au moment de la réparation de l'ADN clivé. Ces réarrangements peuvent modifier le cadre de lecture et produire des gènes non productifs, mais ils produisent également une énorme diversité. Au total, la diversité des IgG est estimée à 10^{12}.

▪ Phylogénie et nomenclature des gènes d'immunoglobuline

Les segments VH de chaîne lourde sont groupés en 7 familles selon leur proximité génétique. L'identité de séquence nucléotidique est supérieure à 80% au sein d'une même famille. Les segments VK se répartissent également en 7 familles et les segments VL en comportent 11.

Le polymorphisme génétique entre individus ajoute un nouveau degré de classification. Les allèles sont indiqués après une étoile. Le polymorphisme identifié par la base de données l'International ImMunoGeneTics information system (IMGT) semble incomplet et faussé par des erreurs de séquençage, et les allèles portés par certaines populations peuvent être sous-représentés ou inconnus *(Scheepers, J immunol, 2015 ; Yu, J Immunol, 2017).* De plus, l'acquisition de mutations après l'activation du lymphocyte B naïf peut rendre hasardeuse l'attribution de l'allèle. C'est également le cas de l'attribution du gène du segment D, car la jonction entre le segment V et D, et le segment D et J peut tronquer en grande partie le segment D d'origine et de nombreux nucléotides peuvent être ajoutés ou supprimés à chacune des jonctions. De plus, les trois cadres de lecture du segment D peuvent être utilisés, bien que le cadre de lecture utilisé préférentiellement soit le deuxième *(Schelonka, J Immunol, 2008).*

B) L'activation et la maturation des lymphocytes B

Au terme de la différenciation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes primaires et avant la mise en contact avec un antigène, les lymphocytes sont naïfs. Ils circulent dans la périphérie et entrent et sortent régulièrement des ganglions lymphatiques. Une grande partie des lymphocytes ne rencontre jamais d'antigène capable de les activer. Au bout d'un certain temps de vie dans la périphérie, ces lymphocytes naïfs non activés sont éliminés par apoptose. Ainsi, le répertoire se renouvelle en permanence et la quantité de lymphocytes naïfs reste à peu près constante.

▪ Tolérance centrale et périphérique

Le répertoire de lymphocytes naïfs ne doit pas contenir de lymphocytes reconnaissant des motifs moléculaires présents dans le corps humain qui constituent des autoantigènes. La sélection négative par apoptose des lymphocytes autoréactifs au cours du processus de différenciation dans les organes lymphoïdes primaires constitue la tolérance centrale. La tolérance périphérique s'exerce sur les lymphocytes autoréactifs qui échappent à la première sélection négative et qui atteignent la périphérie. Ils sont alors éliminés par apoptose ou deviennent anergiques, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent plus être activés. Dans l'infection par le VIH, cette tolérance peut être compromise.

▪ Activation du lymphocyte B

La liaison d'un antigène par le BCR est la première étape de l'activation des lymphocytes B naïfs *(Gulbranson-Judge, Eur J Immunol, 1996).* L'antigène est ensuite internalisé et dégradé en petits fragments peptidiques qui sont présentés à la surface sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Le peptide antigénique est reconnu dans le contexte du CMH II par un lymphocyte T auxiliaire. Celui-ci s'active alors et produit des signaux sous forme de cytokines coordonnant l'activité des lymphocytes B et des macrophages. Le lymphocyte B activé et le lymphocyte T auxiliaire assurant sa stimulation migrent dans un ganglion lymphatique *(Okada, Curr Opin Immunol, 2006).* Le lymphocyte B commence à proliférer tant et si bien qu'un centre germinatif est créé dans le ganglion (Figure I-8). Les lymphocytes se divisant très rapidement sont appelés centroblastes et se concentrent dans la zone foncée du centre germinatif. Ces cellules surexpriment l'enzyme AID (Activation induced cytidine deaminase) à l'origine de l'acquisition d'hypermutations somatiques dans les régions variables de gène d'immunoglobuline qui permet la maturation de l'affinité pour l'antigène *(Jacob, Nature, 1991)*. Ce mécanisme génère une population de lymphocytes B apparentés appelée lignée à partir d'un lymphocyte B naïf unique. La lignée de lymphocytes peut former un arbre

phylogénétique d'une taille considérable, d'autant plus que l'infection est persistante comme c'est le cas de l'infection par le VIH.

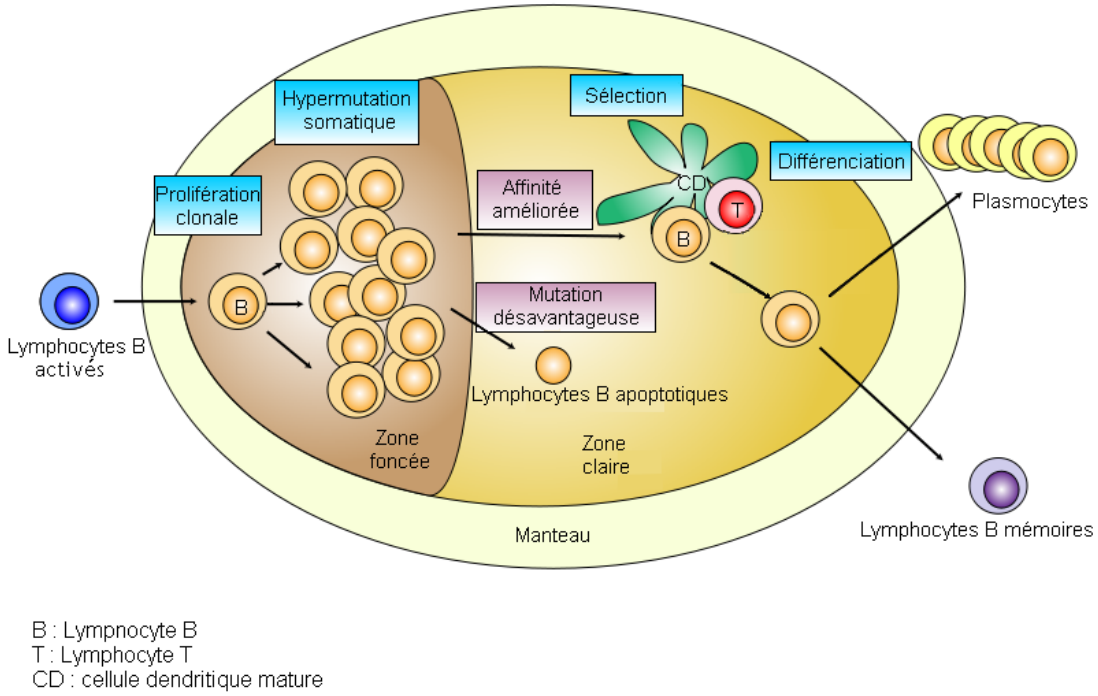


Figure I-8 : Activation, prolifération et différenciation des lymphocytes B dans le centre germinatif d'un ganglion lymphatique. Issu de wikimédia.

- **Hypermutations somatiques**

Les hypermutations somatiques sont des mutations de bases nucléotidiques des gènes d'immunoglobuline *(Martin, Nat Rev Immunol, 2002).* L'enzyme AID catalyse la déamination des cytosines ce qui les convertit en uraciles sur un ADN simple brin en cours de transcription. Le mésappariement non réparé produit la mutation de substitution cytosine en thymine. De plus, les voies de réparation par excision de base ou réparation de mésappariement sont détournées de leur fonctionnement normal de façon à augmenter l'apparition de mutations spécifiquement dans les loci des gènes d'immunoglobuline. Elles produisent des mutations sur la lésion et autour selon des mécanismes encore en partie obscurs *(Peled, Annu Rev Immunol, 2008 ; Chen, Front Med, 2014)*.

L'UNG (uracile DNA glycosylase) déclenche la réparation par excision de nucléotide. Le nucléotide l'uracile issu de la substitution de la cytosine par l'AID est supprimé. Le site devenu abasique peut accueillir n'importe quelle base. Les mésappariements peuvent aussi être corrigés par clivage d'un des brins d'ADN à proximité du mésappariement, excision

d'une partie de l'ADN et reconstitution par l'ADN polymérase. Finalement, la plupart des mutations sont sur des bases adénine ou thymine et non les bases cytosine et guanine déaminées par l'AID.

Les hypermutations somatiques se produisent sur toute la longueur de la région codante VDJ, mais aussi en amont et en aval dans les régions constantes et dans les régions non codantes *(Odegard, Nat Rev Immunol, 2006).* Le taux de mutation dans la région variable est estimé à 10^{-5} ou 10^{-3} par paire de bases par génération quand le niveau de mutations basal du génome est d'environ 10^{-9}. Le brin traduit et le brin non traduit du double brin d'ADN sont tous les deux concernés par les mutations induites par l'AID.

Les séquences fréquemment mutées appelées « hot spots » sont : WRCY RGYW, WA et TW ou W = adénine ou thymine, R= guanine ou adénine, Y = cytosine ou thymine, H = adénine, cytosine ou guanine, S = cytosine ou guanine. Les séquences rarement mutées appelées « cold spots » sont SYC ou GRS. Plusieurs modèles statistiques précisent les séquences « hot spots » et « cold spots » en tenant compte des bases environnantes *(Yaari, Front Immunol, 2013)*

C) Le devenir des cellules du centre germinatif

Après acquisition de mutations, les centroblastes augmentent l'expression de BCR et deviennent des centrocystes qui migrent dans la zone claire du centre germinatif. Les centrocystes qui ont une affinité améliorée pour l'antigène en capturent davantage au niveau de leurs BCR ce qui augmente leur stimulation par les lymphocytes T auxiliaires folliculaires. La compétition entre les centrocystes pour la liaison à l'antigène et les cellules stimulatrices permet la sélection des centrocystes ayant la meilleure affinité pour l'antigène. La vaste majorité des centrocystes meurent par apoptose parce qu'ils n'ont pas amélioré leur affinité voire perdu toute capacité à lier l'antigène.

Les centrocystes exprimant les BCR les plus affins peuvent connaître trois destins. Ils peuvent se retransformer en centroblastes et subir de nouveaux cycles d'hypermutations somatiques dans la zone foncée du centre germinatif ou bien quitter le centre germinatif et se différencier en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires *(Radbruch, Nat Rev Immunol, 2006)*. Les plasmocytes migrent dans les tissus et sécrètent une grande quantité d'anticorps solubles. Des plasmocytes migrant dans la moelle osseuse ou la périphérie des ganglions lymphatiques ont une plus longue durée de vie. Les lymphocytes B mémoires entrent dans un sommeil métabolique prolongé qui leur assure une très longue durée de vie dans la périphérie. Certains survivront éventuellement toute la vie de l'individu, lui conférant une mémoire immunitaire capable de reconnaître l'antigène lors d'une éventuelle réinfection par le même pathogène.

Partie 3) La neutralisation à large spectre

A) La neutralisation à large spectre au cours de l'infection

Au cours de l'infection par le VIH, certaines personnes développent des anticorps capables de neutraliser des virus différents du virus qui les infecte. Cette neutralisation est dite hétérologue par opposition à la neutralisation du virus infectant l'hôte qui est dite autologue. Chez une fraction de personnes infectées, les anticorps neutralisants sont capables de neutraliser une grande partie des souches de VIH circulantes dans le monde. La neutralisation d'un large spectre de virus serait une propriété essentielle des anticorps induits par un vaccin prophylactique, car ils empêcheraient l'infection par la grande diversité de VIH. Cependant, jusqu'à présent, aucune stratégie d'immunisation n'a permis d'induire ce type d'anticorps. L'étude du développement d'anticorps neutralisants à large spectre dans les infections par le VIH permet de comprendre les mécanismes de leur apparition et d'expliquer leur relative rareté chez les personnes infectées. Ces études fournissent des modèles pour le développement de stratégie vaccinale cherchant à induire ce type d'anticorps par immunisation *(Landais, Retrovirology, 2018).*

▪ Evaluation de la largeur de spectre

Pour différencier la neutralisation hétérologue ciblant une faible diversité virale et la neutralisation hétérologue à large spectre, il convient de tester le sérum ou les anticorps pour la neutralisation de virus variés. Le seuil à partir duquel la neutralisation est considérée comme large spectre est subjectif et diffère d'une étude à l'autre parce qu'il n'existe pas de consensus sur le panel de virus à tester et le pourcentage de virus à neutraliser. Ainsi, l'évaluation de la largeur de spectre dépend du panel de virus choisi et elle est d'autant plus fiable que le panel comprend un grand nombre de virus divers. Afin de représenter la grande diversité globale du VIH, les panels doivent inclure des virus de plusieurs sous-types, d'origines géographiques variées et correspondant à des étapes différentes dans l'infection (virus transmis, virus chronique).

Parmi ces panels, le panel de Seaman est l'un des plus grands avec 109 virus représentant les souches circulantes de chaque sous-type *(Seaman, J Virol, 2010)*. Ce panel comprend des virus plus ou moins sensibles à la neutralisation par des mélanges de plasmas de personnes infectées. Ainsi ont été définis les groupes 1, 2 et 3, appelés tiers, de sensibilité à la neutralisation décroissante. Le tiers 1 est subdivisé en groupe 1A et groupe 1B. Les virus de tiers 1 sont particulièrement sensibles à la neutralisation, ils sont fréquemment neutralisés par des plasmas n'ayant aucune autre neutralisation hétérologue. Ce groupe inclus des virus, tels que HXB2 et MN, qui ont été cultivés sur une lignée de lymphocytes T.

En l'absence de pression de sélection par les anticorps neutralisants, les protéines d'enveloppes de ces virus ont dérivé génétiquement au fil des passages et acquis des structures partiellement ouvertes, beaucoup plus susceptibles d'être liées par des anticorps neutralisants *(Moore, AIDS, 1995).* La catégorisation en tiers permet une meilleure comparaison des études entre elles. Les protocoles d'immunisations ont parfois permis une neutralisation des virus de tiers 1 et d'un spectre restreint de virus de tiers 2, mais jamais encore de virus hétérologues de tiers 3.

Un panel de 6 virus a été mis au point pour identifier rapidement les sérums ayant une activité neutralisante hétérologue à large spectre en criblant un grand nombre de donneurs infectés d'une cohorte organisée par l'International AIDS Vaccine Initiative (IAVI), appelée Protocole G *(Simek, J Virol, 2009)*. La neutralisation de ce panel permet de calculer un score de neutralisation qui prend en compte à la fois le pourcentage de virus neutralisés et les dilutions inhibitrices ID50. Ce score est statistiquement prédictif de la largeur de spectre sur de plus larges panels et permet d'identifier des donneurs neutraliseurs d'élite *(Landais, Plos Pathog, 2016)*. Ce panel a été utilisé pour identifier les neutraliseurs d'élite d'une seconde cohorte, le Protocole C de IAVI. L'activité neutralisante d'une sélection de donneurs a ensuite été caractérisée sur un panel de 37 virus *(Landais, Plos Pathog, 2016)*. Cependant, ce panel tend à surestimer la largeur de spectre par rapport à de plus larges panels.

Il faut noter que les panels anciens pourraient ne plus représenter correctement la diversité de souches circulantes contemporaines qui sont celles qui doivent être neutralisées par les anticorps induits par un vaccin. En effet, la protéine d'enveloppe dérive génétiquement à l'échelle de la population mondiale de personnes infectées et semble augmenter sa résistance aux anticorps dirigés en particulier contre certains épitopes *(Mouquet, PNAS, 2012 ; Bouvin-Pley, Plos Pathog, 2013).* Cependant, la combinaison d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant différentes régions est toujours capable de neutraliser les souches circulantes contemporaines *(Bouvin-Pley, J Virol, 2014).*

▪ Fréquence de la neutralisation à large spectre

En l'absence d'un consensus sur le panel de virus à tester et le niveau de neutralisation considéré comme large spectre, la proportion estimée de personnes manifestant une neutralisation à large spectre dans les analyses de cohortes varie. Dans une cohorte, 20 % de personnes infectées neutralisent plus de 75 % de virus d'un panel *(Doria-Rose, J Virol, 2010)*. Dans une autre cohorte et sur un plus grand panel, 50 % de personnes neutralisent au moins 50 % de virus *(Hraber, AIDS, 2014)*. Dans une troisième cohorte, 23% de donneurs neutralisent plus de 80% d'un panel *(Gray, J Virol, 2009).* Dans la cohorte du Protocole G, des panels de tailles réduites ont montrés que 34 % des donneurs ont une activité sur au moins un virus de quatre sous-types *(Simek, J Virol, 2009).* Le panel de 6 virus issu de cette étude a permis de calculer le score de neutralisation des donneurs de la

cohorte du Protocole C *(Landais, Plos Pathog, 2016).* Un score de neutralisation supérieur à 1 est prédictif d'une neutralisation approximativement supérieure à 50% d'un panel de 105 virus à une dilution au centième du sérum. Vingt-cinq pourcent des donneurs du Protocole C ont une neutralisation modérée avec un score entre 0,5 et 1, 11% dépassent un score de 1 et moins de 2% dépassent un score de 2. Finalement, la communauté scientifique s'accorde à dire qu'entre 10 et 20% de personnes infectées ont une neutralisation hétérologue d'une largeur de spectre qui serait satisfaisante si elle était atteinte par vaccination.

- **Cinétique d'apparition de l'activité neutralisante à large spectre**

Les cohortes longitudinales où le sérum des donneurs est collecté régulièrement au cours de l'infection montrent que l'activité neutralisante à large spectre met généralement plusieurs années à apparaître. L'acquisition d'une neutralisation à large spectre semble donc être le fruit d'un long processus d'évolution. Ainsi, dans la cohorte longitudinale du Protocole C, la neutralisation à large spectre apparaît en moyenne 3 ans après l'infection et le maximum de largeur de spectre est atteint en moyenne à 4 ans *(Landais, Plos Pathog, 2016).* Une autre étude de cohorte conclut à une apparition de la neutralisation à large spectre entre 2 et 3 ans d'infection en moyenne *(Mikell, Plos Pathog, 2011).* Dans les deux cohortes, la fréquence des réponses neutralisantes à large spectre semble atteindre un plateau après cette durée. Les donneurs n'ayant pas développé de neutralisation hétérologue à large spectre dans les premières années d'infection ont peu de chance d'en développer après, probablement à cause de l'atteinte du système immunitaire, avec la déplétion des lymphocytes T CD4, qui compromet le développement d'une réponse humorale efficace.

- **Corrélats cliniques du développement de la neutralisation à large spectre**

Puisque toutes les personnes infectées ne produisent pas de réponse neutralisante à large spectre, des particularités cliniques des neutraliseurs d'élite ont été recherchées. La charge virale est le facteur le plus souvent corrélé à la neutralisation à large spectre dans les études de cohortes *(Landais, Plos Pathog, 2016 ; Doria-Rose, J Virol, 2010 ; Sather, J Virol, 2009 ; Piantadosi, J Virol, 2009).* Un modèle se dessine expliquant l'effet d'une haute charge virale sur le développement de la neutralisation à large spectre. Premièrement, la stimulation antigénique forte et continue permettrait l'activation de nombreux lymphocytes B naïfs et augmenterait la probabilité stochastique de l'initiation et de la maturation d'une lignée ayant un potentiel pour une neutralisation à large spectre. De plus, la haute charge virale induit certainement une plus grande diversité virale, favorisant l'apparition d'anticorps capables de s'y adapter *(Piantadosi, J Virol, 2009)*. Bouclant ce cercle vertueux, la neutralisation sélectionne une grande diversité de mutants d'échappement, augmentant la diversité virale. En même temps, une pression de sélection s'exerce sur la protéine d'enveloppe et limite la possibilité d'échappement du virus. Cette pression est d'autant plus

qu'une forte diversité d'IgG cible la protéine d'enveloppe. Ainsi, le titre total d'IgG plasmatiques et les titres d'IgG anti-gp120 et anti-gp41 sont corrélés à la neutralisation à large spectre.

Un faible taux de lymphocytes CD4 est aussi généralement associé à la neutralisation à large spectre. L'explication la plus simple serait que la haute charge virale induit la destruction des lymphocytes CD4 qui se trouve ainsi indirectement corrélée à la neutralisation à large spectre. La plupart des anticorps neutralisants à large spectre ont été isolés chez des patients ne suivant pas de trithérapie et ayant une réplication virale active. En effet, avant 2015, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommandait l'administration du traitement lorsque le patient passait en dessous d'un certain seuil de cellules CD4. Avec l'accumulation d'évidences que l'inhibition de la réplication virale dès les premiers stades de l'infection améliore le pronostic des patients et la globalisation de l'offre de traitement, la directive est désormais de traiter dès le diagnostic de séropositivité *(OMS Guidelines, 2015)*. Cependant, il faut noter qu'en diminuant la charge virale, les traitements antirétroviraux raréfient grandement les réponses neutralisantes à large spectre qui nécessitent une stimulation antigénique forte et continue. Le cas des contrôleurs d'élite corrobore cette idée. De façon cohérente avec une faible stimulation antigénique due à une charge virale faible, ils développent rarement des anticorps neutralisants à large spectre *(Doria-Rose, J Virol, 2010 ; Bailey, J Virol, 2006).* Par ailleurs, il faut noter que les traitements antirétroviraux interfèrent avec le test de neutralisation *in vitro* comme le montre la neutralisation d'un contrôle négatif sur un pseudovirus exprimant à sa surface une protéine d'enveloppe du virus de la leucémie murine (MLV).

Le taux de lymphocytes T auxiliaires folliculaires est également un facteur qui promeut l'apparition de la neutralisation à large spectre, certainement par leur rôle de support à l'acquisition d'hypermutations somatiques par les lymphocytes B dans les centres germinatifs *(Niessl, Viruses, 2018 ; Moysi, Retrovirology, 2018 ; Locci, Immunity, 2013 ; Cohen, J Virol, 2014).*

- **Une lignée d'anticorps explique la neutralisation par le sérum**

La neutralisation à large spectre pourrait s'expliquer par le développement de nombreux anticorps reconnaissant chacun un nombre limité de souches virales. Cependant, l'isolement d'anticorps neutralisants à large spectre a permis de montrer que la réponse neutralisante à large spectre du sérum est le plus souvent expliquée par une lignée d'anticorps unique issue de l'activation d'un lymphocyte B naïf. Ainsi, les anticorps isolés ciblant un épitope unique sont généralement capables de reproduire le spectre de neutralisation du sérum. Une seule région est ciblée par la lignée qui a acquis au cours de son évolution la faculté de reconnaître un motif conservé sur un grand nombre de souches.

B) Les anticorps monoclonaux neutralisants à large spectre

▪ Isolement des anticorps neutralisants à large spectre

Il existe deux techniques principales pour l'isolement d'anticorps spécifiques d'un antigène. La première consiste à trier tous les lymphocytes B mémoires d'échantillons de sang périphérique. Ils sont activés par un mélange de cytokines ou immortalisés par le virus EBV puis cultivés en dilution limite à environ une cellule par puits afin de faire produire l'anticorps correspondant à chaque lymphocyte. Ensuite, un criblage fonctionnel par liaison à l'antigène ou neutralisation permet d'identifier les anticorps neutralisants à large spectre. Les gènes d'immunoglobulines correspondant sont amplifiés par PCR (Polymerase chain reaction) puis séquencés et clonés. Les anticorps sont exprimés de façon recombinante et caractérisés en profondeur pour leur propriété neutralisante.

La deuxième méthode nécessite de connaître l'antigène voire l'épitope ciblé par les anticorps. Grace au FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), on trie uniquement les lymphocytes B mémoires se liant préférentiellement à une protéine appât par rapport à une protéine appât mutée au niveau du site de liaison des anticorps. Le tri est indexé, ce qui signifie qu'on a accès aux intensités de fluorescence de chaque lymphocyte pour chaque appât. On a ainsi une indication de la spécificité de chaque lymphocyte pour la région d'intérêt ce qui facilite ensuite l'identification de la lignée ou des lignées responsables de la neutralisation à large spectre. Les gènes d'immunoglobulines des lymphocytes B mémoires sont amplifiés, séquencés, puis clonés pour l'expression recombinante des IgG. Contrairement à la première méthode qui implique de cultiver un grand nombre de lymphocytes B mémoires, cette méthode réduit considérablement le nombre de lymphocytes à manipuler. Cependant, cette méthode induit un biais important par le choix de l'appât. En opérant un tri avec une gp120 monomérique comme appât, on passerait ainsi à côté d'anticorps ne reconnaissant que la forme trimérique de la protéine d'enveloppe. Cette méthode nécessite donc d'avoir préalablement amplement caractérisé la neutralisation du sérum.

▪ 5 régions conservées ciblées par les anticorps neutralisants à large spectre

L'isolement d'anticorps neutralisants à large spectre et la cartographie de leur spécificité à la surface de la protéine d'enveloppe ont permis de définir cinq régions conservées du trimère d'enveloppe. Les épitopes reconnus couvrent maintenant presque toute la surface de la protéine d'enveloppe (Figure I-9).

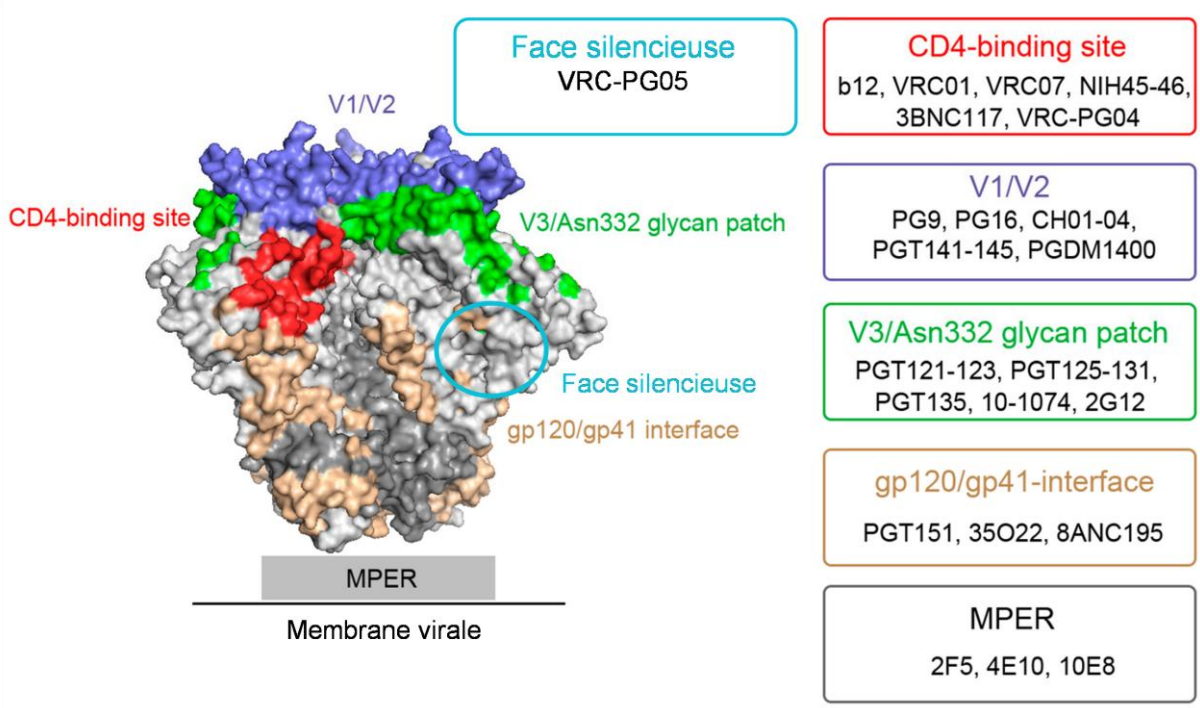


Figure I-9 : Épitopes ciblés par quelques anticorps neutralisants à large spectre représentés sur la structure du trimère soluble BG505.664 PDB 4TVP, gp120 (gris clair), gp41 (gris foncé). Des exemples d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant six régions sont indiqués. La région de la face silencieuse a été ajoutée. Adapté de Zhang, Int J mol Sci, 2016.

- CD4bs

Le site de liaison au récepteur CD4 (CD4bs) est très conservé. Il se trouve à cheval sur le domaine interne et le domaine externe de la gp120 qui communiquent par un feuillet bêta pontant dans la forme liée au CD4. Les anticorps neutralisants à large spectre ciblant cette région comme VRC01 ou 8ANC131 issus de différents donneurs ont de nombreuses similarités *(Wu, Science, 2011 ; Zhou, Science, 2010 ; Scheid, Science, 2011).* Ils partagent le même usage de gène (VH1-2 ou VH1-46) constituant un long CDRH2, adoptent une structure qui imite le CD4 pour permettre l'interaction et sont fortement mutés.

- MPER

La région externe proche de la membrane lipidique du virion sur la gp41 (Membrane Proximal External Region dit MPER) est ciblée entre autres par les anticorps 10E8, 2F5 et 4E10. Ils reconnaissent des peptides linéaires d'une hélice alpha amphiphatique en partie incluse dans la membrane lipidique. Certains anticorps ciblant le MPER reconnaissent des lipides de la membrane, ce qui expliquerait leur tendance à la polyréactivité.

- Apex V1/V2

Les boucles V1 et V2 de la gp120 s'organisent en un domaine replié en tonneau bêta de 5 brins à l'apex du trimère et s'engagent dans des interactions entre protomères. L'épitope de deux anticorps ciblant cette région, PG9 et PG16, se situe sur un brin et

comprend deux glycanes N160 et N156 ou N137. Les anticorps neutralisants à large spectre ciblant cette région ont tous une longue boucle CDRH3 et sont généralement dépendants de la structure quaternaire du trimère d'enveloppe, c'est-à-dire que leurs sites de liaison sont à cheval sur plusieurs protomères et ne sont présents que sur la forme trimérique.

- Interface gp120-gp41

Des anticorps neutralisants à large spectre ciblent la région à l'interface entre la gp120 et la gp41 (PGT151, 35O22, 8ANC195 et VRC34) en formant des contacts avec des glycanes et des résidus protéiques des deux sous-unités *(Blattner, Immunity, 2014).* Du fait de leur interaction quaternaire avec le trimère et parce qu'ils reconnaissent préférentiellement les formes clivées, ils peuvent être utilisés pour purifier des trimères solubles et vérifier leur bonne conformation.

- Face silencieuse

Récemment, l'anticorps VRC-PG05 a été isolé et cible une région qui était auparavant considérée comme résistante à la reconnaissance par les anticorps neutralisants, d'où son nom de face silencieuse *(Zhou, Immunity, 2018).* Cet anticorps cible les glycanes N295, N448 et N262 entre la région du patch riche en mannose et la région à l'interface entre la gp120 et la gp41.

- Boucle V3

La boucle V3 entre le pont disulfure entre les cystéines 296 et 331 est très immunogénique et est parfois qualifiée d'immunodominante, car l'essentiel de la réponse humorale contre la gp120 cible cette région. Dès 1989, on découvre qu'un peptide de cette séquence peut induire des anticorps neutralisants *(Javaherian, PNAS, 1989).* Cependant, le caractère souche-spécifique de cette réponse est déjà souligné. Avec l'accumulation d'informations précises sur la structure du trimère d'enveloppe, il a été montré que la couronne au sommet de la boucle est ciblée par des anticorps qui manquent d'activité neutralisante, à large spectre en particulier. L'épitope est caché par les boucle V1 et V2 dans le contexte du trimère natif des isolats primaires *(Wu, Virology, 2008).* Cette réponse est requalifiée d'indésirable, car elle pourrait compromettre des réponses plus neutralisantes ou plus large spectre par un effet de compétition.

La base de la boucle V3 côté C-terminal est quant à elle exposée, mais hautement glycosylée et correspond au patch riche en mannose centré autour du glycane en position N332 qui nous intéresse dans ce manuscrit. Les réponses ciblant la région du patch riche en mannose sont les plus fréquentes. Quarante pourcent de donneurs sélectionnés du Protocole C ont une activité neutralisante à large spectre diminuée par des mutations simples ou doubles de sites de glycosylation de la région N332 ce qui fait de cette région la plus fréquemment ciblée par les anticorps neutralisants à large spectre et donc d'un grand intérêt dans une perspective vaccinale *(Landais, Plos Pathog, 2016).* Plusieurs lignées

d'anticorps ciblant cette région ont été isolées chez des donneurs infectés de la cohorte du Protocole C et seront décrites dans la dernière partie de cette introduction.

A l'inverse, les réponses neutralisantes à large spectre contre le site de liaison au CD4 et contre la région MPER semblent être les moins probables comme le suggère leur faible occurrence dans les cohortes. Ceci pourrait indiquer que les contraintes qui s'opposent à leur développement sont plus importantes que pour les réponses ciblant d'autres régions. Enfin, l'activité neutralisante à large spectre d'une large proportion de donneurs ne peut être cartographiée sur aucune région connue, suggérant que la sensibilité d'autres régions du trimère reste à caractériser comme ça a été le cas pour la région de la face silencieuse récemment décrite *(Zhou, Immunity, 2018)* ou du peptide de fusion *(Xu, Nat Med, 2018)*. Pour certains donneurs, il est également possible que plusieurs spécificités résultent en une activité neutralisante à large spectre et compliquent l'analyse des résultats de cartographie.

▪ Mécanisme de la neutralisation

La neutralisation du virus peut être due à l'encombrement stérique que produit la liaison de l'anticorps sur la protéine d'enveloppe et qui empêche la liaison de cette dernière sur ces récepteurs. C'est le cas des anticorps ciblant le CD4bs, mais aussi d'anticorps ciblant le patch riche en mannose. Ainsi, l'anticorps PGT121 a un effet allostérique sur la protéine d'enveloppe qui empêche la liaison du récepteur CD4. L'anticorps 2G12 empêche la liaison au corécepteur CCR5 *(Julien, Plos Pathog, 2013).* Certains anticorps comme 2F5 et 4E10 dirigés contre le MPER pourraient accélérer la dégradation des protéines d'enveloppe par dissociation et relargage des gp120 *(Ruprecht, JEM, 2011)* . L'anticorps PGT128 dirigé contre la région N332 diminue la demi-vie des virus. Si cet effet n'est pas encore expliqué, il semble dépendant de la liaison bivalente de l'IgG (*Pejchal, Science, 2011).* Le mécanisme de neutralisation n'est donc pas toujours élucidé avec certitude, mais en l'état actuel des connaissances, il semble que la liaison au trimère natif et fonctionnel soit la condition nécessaire et suffisante pour la neutralisation.

C) Le développement des anticorps neutralisants à large spectre dans l'infection par le VIH

▪ Les contraintes sur le développement d'anticorps neutralisants à large spectre

Si l'activité neutralisante hétérologue est fréquente, les lignées d'anticorps qui parviennent à acquérir une neutralisation hétérologue à large spectre sont plus rares. Le développement de telles réponses n'est-il pas possible chez toutes les personnes infectées ou immunisées ? Jusqu'à présent, hormis la forte stimulation antigénique lié à la haute charge virale, aucune particularité propre aux neutraliseurs d'élite n'explique qu'ils soient les seuls capables de neutralisation à large spectre. Cependant, un certain nombre de limitations inhérentes au système immunitaire et à l'infection par le VIH peuvent expliquer leur relative rareté et leur développement tardif dans l'infection.

➢ <u>Faible nombre de trimères</u>

Le faible nombre de trimères d'enveloppe à la surface du virion pourrait compliquer l'activation des lymphocytes B naïfs qui ont besoin d'engager plusieurs BCR pour s'activer *(Zhu, PNAS, 2003 ; Schiller, Plos Pathog, 2014 ; Bachmann, Immunol Today, 1996).* Cependant, l'espacement des trimères permet une approche de toute la surface du trimère et par tous les angles possibles.

➢ <u>Répertoire limité en lymphocytes B naïfs précurseurs de lignées à large spectre</u>

Le lymphocyte B naïf ayant un potentiel pour le développement d'anticorps neutralisants à large spectre peut être rare dans le répertoire, ou même n'avoir qu'une faible probabilité d'être généré sur une longue période. La faible probabilité stochastique de l'apparition et de l'activation du bon lymphocyte B naïf par la présence simultanée d'un antigène capable d'initier une réponse pouvant évoluer vers une largeur de spectre, expliquerait la relative rareté des réponses neutralisantes à large spectre chez les personnes infectées. De façon encourageante, une étude suggère qu'il n'y a pas de différence entre le répertoire naïf des personnes développant des anticorps neutralisants à large spectre et les personnes qui n'en développent pas *(Scheepers, J Immunol, 2015)*.

➢ <u>Compétition entre anticorps</u>

L'activation et la poursuite du développement d'une lignée entrent en compétition avec d'autres anticorps ciblant la même région. Si ceux-ci ont une meilleure affinité, ils peuvent éventuellement compromettre le développement d'anticorps initialement de plus faible affinité, mais ayant un potentiel pour la neutralisation à large spectre *(Xiao, Biochem Biophys Res Commun, 2009).* La compétition s'exerce aussi entre anticorps d'une même lignée.

- Taux d'hypermutations somatiques

Les anticorps neutralisants à large spectre sont généralement issus d'une longue évolution par cycles répétés d'hypermutations somatiques dans le centre germinatif. En conséquence, leurs taux de mutations par rapport aux lymphocytes B naïf est particulièrement élevé, souvent supérieur à 10% et jusqu'à 35 % de mutations de nucléotides sur la chaîne lourde. Ce taux extrême de mutations était précédemment supposé être délétère à la fonction des immunoglobulines. Si un taux élevé d'hypermutations somatiques est nécessaire pour l'acquisition d'une neutralisation à large spectre, cela pourrait expliquer la rareté des anticorps neutralisants à large spectre, car seule une fraction d'anticorps atteint de pareils taux d'hypermutations somatiques.

Le taux d'hypermutations somatiques qui peut être atteint par vaccination semble également limité. Par exemple, les taux de mutations moyens pour des vaccinations contre le tétanos ou la grippe ne dépassent pas 10 % après de multiples immunisations *(Poulsen, J Immunol, 2011).*

- Indels

Les insertions et délétions de nucléotides (indels) dans le gène des immunoglobulines sont assez rares dans le répertoire de lymphocytes B mémoires de sujets sains *(Wilson, JEM, 1998),* mais plus fréquents chez les sujets infectés par le VIH *(Kepler, Cell Host Microbe, 2014).* La fréquence des indels est directement corrélée aux taux d'hypermutations somatiques. Les sites les plus fréquemment concernés par les indels se situent dans le CDR1 et le CDR2 correspondant aux régions proches de l'interaction avec l'antigène, mais les régions FR peuvent aussi en contenir *(Briney, Gene Immun, 2012).* Les insertions se produisent en grande partie par duplication de petites séquences. Les familles d'immunoglobuline VH4, utilisées par de nombreux anticorps neutralisants à large spectre, notamment ceux qui ciblent la région N332, ont plus fréquemment des indels *(Briney, Gene Immun, 2012)*.

Il a été montré que les indels sont parfois un prérequis à l'acquisition de la largeur de spectre. Ainsi, l'anticorps VRC01 contient une délétion de 6 nucléotides dans la boucle CDRL1 qui autrement bloquerait l'accès de la boucle CDRL2 à l'antigène *(Zhou, Science, 2010).* La neutralisation par l'anticorps CH31, proche de VRC01, n'apparaît qu'après acquisition d'une insertion de 27 acides aminés dans la boucle CDRH1. De plus, l'insertion améliore l'affinité de liaison *(Kepler, Cell Host Microbe, 2014).* Si les indels sont nécessaires à l'acquisition de la neutralisation à large spectre, cela peut expliquer en partie la rareté des réponses neutralisantes à large spectre. Par ailleurs, on ne sait pas comment favoriser l'apparition d'indels par immunisation et cela pourrait constituer un obstacle au développement d'un vaccin efficace contre le VIH.

- Longues boucles CDR

Les anticorps neutralisants à large spectre ciblant l'apex, la région N332 ou le MPER, ont généralement une longue boucle CDRH3 qui est nécessaire à la pénétration du bouclier de glycanes et à l'interaction avec les résidus protéiques sous-jacents. Ainsi, la longeur des boucles CDRH3 des anticorps ciblant le MPER et la région N332 avoisine souvent 20 acides aminés. L'anticorps ciblant l'apex PGT145 a une boucle CDRH3 extrêmement longue de 32 acides aminés. Ces longues boucles CDRH3 sont rares dans le répertoire de lymphocytes B qui ont une longueur moyenne de 14 acides aminés.

La longueur des boucles CDR peut être héritée de la recombinaison VDJ plutôt que par mutations ou insertions et délétions *(Briney, Plos One, 2012).* Ainsi, l'utilisation des gènes D2 ou D3 et JH6 est plus fréquente pour les anticorps comportant un long CDRH3, ce qui correspond à l'usage de gènes des anticorps neutralisants à large spectre ciblant l'apex PG9 et PG16 contenant tous deux des CDRH3 de 30 acides aminés. Ceci illustre sans doute la limitation d'usage de gène pour parvenir à une longue boucle CDRH3. Les longues boucles CDRH3 semblent donc un facteur limitant la fréquence des réponses neutralisantes à large spectre.

Par ailleurs, les longues boucles CDRH3 semblent associées statistiquement à l'autoréactivité, et les lymphocytes B qui en comportent pourrait être supprimées en partie du répertoire de lymphocytes B naïfs *(Meffre, J Clin Invest, 2001 ; Wardemann, Science, 2003).* L'induction de longues boucles CDRH3 par vaccination pourrait donc être problématique.

- Autoréactivité

L'autoréactivité et la polyréactivité sont des propriétés relativement fréquentes des anticorps neutralisants à large spectre *(Liu, J Virol, 2014).* Les anticorps reconnaissant des glycanes peuvent se montrer autoréactifs contre des protéines humaines portant des glycanes similaires. L'autoréactivité est aussi un obstacle pour les anticorps ciblant la région MPER qui contactent directement des lipides et sont « collants » c'est-à-dire qu'ils ont tendance à interagir par interactions hydrophobes avec de nombreuses molécules dont des autoantigènes *(Yang, JEM, 2013 ; Haynes, Science, 2005).*

Chez les personnes infectées par le VIH, les points de contrôle et d'élimination des cellules autoréactives peuvent être compromis, étant donné la désorganisation générale du système immunitaire due à la mortalité des cellules CD4. Ceci expliquerait que des lymphocytes B naïfs qui sont normalement supprimés du répertoire ou anergiques puissent être activés chez les personnes infectées par le VIH. A noter que les maladies autoimmunes sont une comorbidité de l'infection par le VIH de plus en plus prépondérante avec l'allongement de la durée de vie des personnes séropositives *(Vega, Pharmacol Res, 2018).*

La fréquence de ces lymphocytes B naïfs autoréactifs précurseurs de lignées à large spectre pourrait être largement réduite dans la population générale par rapport aux

personnes infectées, ce qui pourrait compromettre la capacité d'un vaccin à induire des anticorps neutralisants à large spectre. De plus, si ces lymphocytes B naïfs sont présents dans le répertoire, leur activation par un immunogène et leur prolifération clonale pourraient être inhibées par leurs propriétés anergiques *(Verkoczy, Curr Opin HIV AIDS, 2014).* Par ailleurs, si l'induction de tels anticorps est possible, il devra être vérifié qu'aucun trouble autoimmun n'apparaît chez les sujets immunisés.

▪ La coévolution entre lignées d'anticorps et virus

Lors de l'infection, la stimulation antigénique par le VIH a pour seule origine la population diverse de virus autologues. L'acquisition d'une neutralisation hétérologue contre un virus différent du virus infectant l'hôte ne peut donc être comprise que comme un sous-produit hasardeux de l'évolution de ces anticorps en réponse à la diversification et à l'échappement constant du virus autologue. Comprendre comment cette stimulation antigénique aboutit à la neutralisation à large spectre est notre objectif pour comprendre comment reproduire le même résultat par vaccination. Ainsi, les études longitudinales des neutraliseurs d'élite ont permis de commencer à révéler comment les anticorps neutralisants à large spectre sont induits et se développent au cours de l'infection *(Landais, Retrovirology, 2018)*.

➢ <u>Activation des lymphocytes B naïfs</u>

Dès l'installation de l'infection, de nombreux lymphocytes B naïfs sont activés par liaison d'antigènes viraux à l'anticorps du lymphocyte exprimé à sa surface et nommé récepteur de cellules B (BCR). Dans le cas des anticorps neutralisants à large spectre, il est important de connaître la séquence du BCR du lymphocyte B naïf à l'origine de la lignée. C'est en effet ce lymphocyte qu'il faudra éventuellement activer par vaccination. La séquence de cet anticorps ancêtre commun non muté (UCA) peut être inférée à partir des séquences des anticorps peu mutés apparus précocement dans l'évolution de la lignée. L'inférence de la séquence de l'UCA est d'autant plus fiable si on dispose d'anticorps précoces de la lignée, ce qui est facilité par le séquençage nouvelle génération des gènes d'immunoglobuline.

Cependant, la neutralisation de virus ou la liaison à la protéine d'enveloppe par l'UCA ne sont pas toujours mises en évidence *(MacLeod, Immunity, 2016 ; PC39, manuscrit en cours d'écriture)*. Hormis une approximation erronée de la séquence de l'UCA, une difficulté réside dans l'identification du variant de protéine d'enveloppe ayant activé le lymphocyte B naïf, parmi la population de virus diverse, même à des temps précoces après l'infection. Par ailleurs, le lymphocyte peut être activé par simple liaison à l'antigène, sans neutralisation, et on ne peut être certain de la forme exacte de la protéine d'enveloppe qui s'est fixée à l'UCA. Enfin, l'affinité minimale de cette liaison pour activer le lymphocyte B naïf n'est pas connue, mais pourrait être très faible, comme montré chez les souris *(Dal Porto, JEM, 2002).*

- Stade précoce de la réponse humorale

Quelques jours après le début de l'infection, les premiers anticorps reconnaissant la gp41 puis la gp120 apparaissent *(Moore, J Virol, 1994).* Cependant, ces anticorps ne sont pas nécessairement neutralisants. En effet, on n'observe pas de pression de sélection sur l'évolution de la protéine d'enveloppe à ce stade précoce de l'infection. En quelques semaines, une réponse neutralisante apparaît, qui exerce alors une pression de sélection sur la population virale en rapide diversification. Les virus autologues mutent ce qui permet la sélection rapide de variants échappant à cette réponse humorale initiale de l'hôte *(Richmann, PNAS, 2003).* De façon générale, l'immunité humorale ne parvient pas à enrayer l'infection car l'évolution du virus autologue a un temps d'avance sur l'évolution de la réponse humorale. Ainsi, le VIH installe une infection persistante en augmentant régulièrement son réservoir et en détruisant peu à peu les lymphocytes CD4.

- Apparition de la neutralisation à large spectre

Cependant, au cours de l'infection, les variants viraux continuent à induire des anticorps et permettent donc la sélection d'anticorps qui sont capables d'accommoder les changements antigéniques *(Tomaras, J Virol, 2008 ; Richman, PNAS, 2003)*. Chez certains individus, un enchaînement d'évenements d'échappement viral et d'adaptation immunitaire résulte en la sélection d'anticorps neutralisants capables de reconnaître une grande variété de virus autologues et hétérologues d'une largeur de spectre variable. C'est ce mécanisme aboutissant aux anticorps neutralisants à large spectre qu'on appelle maturation et que nous cherchons à décrypter avec l'étude longitudinale des lignées d'anticorps. Ainsi, les travaux sur les lignées d'anticorps ciblant le CD4bs, l'apex ou la région N332, ont montré que les anticorps précoces des lignées ont un spectre étroit et une capacité de neutralisation faible. C'est la sélection progressive par les variants d'échappement viraux successifs qui conduit à la neutralisation à large spectre à faible concentration d'anticorps.

- Maturation de la reconnaissance de l'épitope

Les études structurales de lignées d'anticorps neutralisants à large spectre permettent parfois de mettre en lumière des mécanismes de maturation expliquant pourquoi les anticorps neutralisants à large spectre parviennent à neutraliser un grand nombre de souches quand les intermédiaires plus précoces de leur évolution en sont incapables *(Mishra, Front Immunol, 2018)*.

On peut distinguer deux mécanismes plausibles pour l'acquisition de la neutralisation à large spectre. Premièrement, la maturation des anticorps pourrait permettre d'éviter l'implication de parties variables dans la reconnaissance de la protéine d'enveloppe, en favorisant de plus en plus la reconnaissance de parties plus constantes, comme des petits segments protéiques ou des motifs conformationnels, très conservés au sein de la population globale de virus. Ainsi, l'acquisition de la neutralisation à large spectre par certains anticorps correspondrait à la capacité à reconnaître des épitopes resserrés ou

focalisés sur des motifs strictement conservés. A l'inverse, les anticorps précoces et intermédiaires nécessiteraient pour leur fixation à la protéine d'enveloppe, des motifs variables associés. Alternativement, les anticorps pourraient parvenir à la neutralisation à large spectre en augmentant leur tolérance à la variabilité de leurs épitopes. Comme nous allons le voir, le cas des anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332, est une démonstration de la capacité des lignées à s'adapter à l'énorme variabilité de l'antigène, notamment par la reconnaissance alternative de différents glycanes de la région riche en mannose *(Sok, Sci Transl Med, 2014).*

Par ailleurs, concernant des antigènes autres que le VIH, il a été proposé que la rigidification du paratope était un mécanisme courant de la maturation de l'affinité des anticorps pour leurs épitopes (*Jimenez, PNAS, 2004 ; Manivel, Immunity, 2000)*. Ainsi, les régions variables des BCR des lymphocytes B naïfs seraient flexibles, leur permettant d'être activé par des antigènes divers. Puis, la spécificité pour l'antigène serait affinée par une stabilisation du paratope. Pour vérifier cette hypothèse dans le cas des anticorps ciblant la protéine d'enveloppe du VIH, qui est plus variable et plus complexe que la plupart des antigènes, la dynamique des anticorps de plusieurs lignées à large spectre, ciblant le CD4bs et l'apex, a été étudiée *(Davenport, Structure, 2016).* Cette étude suggérait que les hypermutations somatiques, acquises au cours de la maturation, résultaient en une stabilisation de certaines parties des anticorps, notamment des régions adjacentes au paratope. Cette restriction de la flexibilité pourrait permettre une amélioration de la complémentarité avec les parties les plus constantes de l'épitope et l'évitement d'un encombrement stérique avec les parties variables adjacentes.

La maturation d'une autre lignée anticorps ciblant l'apex, montrait une réorientation de la chaîne légère, en réponse à des insertions dans la protéine d'enveloppe, permettant d'éviter un encombrement stérique *(Fera, PNAS, 2014).* Deux études de lignées d'anticorps ciblant l'apex suggéraient également une acquisition de la neutralisation à large spectre par ces deux mécanismes *(Landais, Immunity, 2017 ; Doria-Rose, Nature, 2014).* Les hypermutations somatiques acquises au cours de l'évolution semblaient induire la rigidification du paratope, notamment au niveau du CDRH3, et le changement de l'angle d'approche avec la protéine d'enveloppe.

Nous avons vu précédemment que les anticorps neutralisants à large spectre contenaient fréquemment des indels. Dans certains cas, il a été montré que ces indels sont nécessaires à l'acquisition de la neutralisation à large spectre. Par exemple, une délétion dans la chaîne légère des anticorps neutralisants à large spectre de type VRC01, permet l'adaptation du glycane N276, proche de l'épitope, *(Zhou, Immunity, 2013)* et une insertion dans la chaîne lourde de deux d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant l'interface leur permettent de pénétrer le bouclier de glycane pour former des interactions avec les résidus protéiques *(Schrarf, Cell, 2015 ; Huang, Nature, 2014).*

- Diversification des lignées

L'évolution des lignées d'anticorps montre souvent une diversification très précoce après l'apparition des lignées, suivie de l'évolution parallèle de plusieurs branches constituant des sous-lignées. Certaines branches poursuivent leur maturation tandis que d'autres aboutissent à des impasses, car les anticorps ne reconnaissent plus les variants de virus autologue. Ainsi, l'étude de la lignée du donneur PC76 montrait que l'échappement viral coïncidait avec une phase de contraction, où la fréquence des anticorps de la lignée diminuait drastiquement (*MacLeod, Immunity, 2016)*.

Les lymphocytes qui continuent à reconnaître les variants du virus autologue peuvent continuer leur évolution en acquérant des mutations bénéfiques à la neutralisation autologue. Finalement, certaines mutations sont également bénéfiques à la neutralisation hétérologue et la neutralisation à large spectre peut ainsi être acquise par plusieurs branches ayant adapté des solutions différentes pour reconnaître l'épitope *(MacLeod, Immunity, 2016 ; Bonsignori, J Virol, 2011 ; Sok, Plos Pathog, 2013).*

L'analyse longitudinale des lignées montre que toutes les hypermutations somatiques ne sont pas bénéfiques à la neutralisation à large spectre. Ainsi, certains anticorps acquièrent de forts taux de mutations sans améliorer la largeur de spectre de leur neutralisation *(Bhiman, Nat Med, 2015 ; Doria-Rose, Nature, 2014).* Ces anticorps peuvent appartenir à des branches dont la trajectoire évolutive a peu de chance de conduire à la neutralisation à large spectre. Il est difficile d'estimer la proportion de ces sous-lignées dans les lignées à large spectre ainsi que la proportion des lignées n'atteignant jamais la neutralisation à large spectre, car les méthodes d'isolement des anticorps monoclonaux se concentrent généralement sur l'identification spécifique des anticorps neutralisants à large spectre *(Landais, Retrovirology, 2018).* Pourtant, ces lignées ou sous-lignées pourraient jouer un rôle important de coopération, en induisant des mutants d'échappements qui augmentent la diversité de l'épitope et favorisent l'apparition des anticorps neutralisants à large spectre. En effet, on a pu mettre en évidence que des mutations d'échappements au niveau de l'épitope de lignées non large spectre amélioraient la liaison et la neutralisation par des lignées en cours de maturation vers le large spectre *(Gao, Cell, 2014 ; Bonsignori, Sci Transl Med, 2017)*.

- Diversification virale

Un pic de diversification virale est souvent concomitant avec l'apparition de l'activité neutralisante à large spectre dans le sérum *(Doria-Rose, Nature, 2014 ; Liao, Nature, 2013 ; Landais, Immunity, 2017)*. Ceci pourrait s'expliquer par une forte pression de sélection induite par les anticorps neutralisants de la lignée à large spectre *(Bhiman, Nat Med, 2015)* ou d'autres lignées ciblant le même épitope. La diversité virale au moment de l'apparition d'anticorps neutralisants avec une largeur de spectre intermédiaire pourrait être favorable à la maturation des anticorps vers la neutralisation à large spectre, puisque l'émergence de nombreux mutants d'échappements sélectionnent les anticorps capables de les reconnaître.

Par ailleurs, toutes les mutations d'échappements ne sont pas possibles, car certaines sont trop déstructurantes et délétères à la réplication virale ou augmentent la sensibilité à la neutralisation par des anticorps déjà présents dans le sérum. L'échappement viral est donc limité par le coût sur le fitness réplicatif ce qui explique que certaines régions soient plus conservées et représentent des zones de vulnérabilités qui sont ciblées par les anticorps neutralisants à large spectre. L'exposition antigénique peut ainsi être prolongée par une limitation dans les possibilités d'échappement viral ce qui semble favorable à l'apparition des anticorps neutralisants à large spectre *(Bhiman, Nat Med, 2015 ; Landais, Immunity, 2017 ; Anthony, J Virol, 2017 ; Reh, Plos Pathog, 2018)*.

Ainsi, la diversité virale et la diversité d'anticorps à un stade précoce de l'évolution des lignées seraient des facteurs clés pour le développement subséquent d'une neutralisation à large spectre.

- <u>Echappement final</u>

Lorsque l'activité neutralisante à large spectre apparaît, plusieurs années après le début de l'infection, la diversité génétique et la taille du réservoir viral facilitent l'échappement viral. Ainsi, les lignées d'anticorps à large spectre ne parviennent généralement pas à neutraliser la totalité de la population virale autologue contemporaine et il se produit finalement un échappement viral total avec sélection de virus autologues qui échappent de façon définitive à la neutralisation par tous les anticorps de la lignée à large spectre. Cette absence de contrôle viral par les anticorps neutralisants à large spectre dans l'infection naturelle n'est cependant pas un obstacle dans le cadre d'un vaccin. L'infection serait bloquée par les anticorps neutralisants avant que le virus n'ait l'opportunité de se diversifier et d'échapper à ces anticorps.

D) L'induction d'anticorps neutralisants à large spectre par vaccination

Les modèles animaux suggèrent fortement que l'induction par vaccination d'anticorps neutralisants à large spectre protégerait de l'infection, et l'obtention de telles réponses par immunisation est une priorité de la recherche vaccinale. A ce jour, l'immunisation d'animaux avec différentes constructions de protéine d'enveloppe a permis d'induire des anticorps neutralisant les virus homologues et des virus hétérologues de tiers 1, mais rarement des virus hétérologues de tiers 2 et jamais de véritables lignées neutralisantes à large spectre *(Klasse, Plos Pathog, 2018 ; Sanders, Science, 2015).* Comme nous allons le voir, l'étude fonctionnelle et structurale des anticorps neutralisants à large spectre dans l'infection naturelle, ainsi que leurs précurseurs et leurs développements, permet de comprendre les déterminants moléculaires de l'acquisition d'une neutralisation à large spectre, et d'imaginer des stratégies vaccinales prenant ces anticorps pour modèle *(Mascola, Immunol Rev, 2013).*

▪ Identifier les points communs du développement de plusieurs lignées ciblant la même région

L'étude des précurseurs, du développement et des caractéristiques structurales des anticorps neutralisants à large spectre a permis de mettre en évidence des ressemblances frappantes, notamment pour les anticorps ciblant les régions de l'apex *(Andrabi, Immunity, 2015 ; Gorman, Nat Struct Mol Biol, 2016)* et du CD4bs *(Zhou, Immunity, 2013)*. Ainsi, une restriction de l'usage de gène d'immunoglobuline, des similarités dans les hypermutations somatiques ou indels, ainsi que des similarités dans les caractéristiques des variants viraux produisant la stimulation antigénique, sont retrouvés chez plusieurs lignées d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant une région donnée issus de différents donneurs.

Le fait que plusieurs donneurs utilisent des processus de maturation similaires est très encourageant, car cela semble indiquer que les évenements qui aboutissent à la reconnaissance à large spectre de ces régions ne sont pas aussi improbables qu'on ne l'estimait précédemment et qu'une stratégie d'immunisation imitant la stimulation antigénique chez ces donneurs pourrait reproduire le même résultat par vaccination.

▪ Cibler le lymphocyte B naïf

Les stratégies qui visent à induire des anticorps neutralisants à large spectre similaires aux anticorps isolés cherchent à reproduire les évènements de coévolution entre l'antigène et les lymphocytes B, en premier lieu, l'activation des lymphocytes B naïfs précurseurs des lignées à large spectre. L'immunogène doit donc comporter les éléments

d'épitope reconnus par des lymphocytes B naïfs précurseurs de lignées à large spectre et présents chez une majorité de sujets, comme expliqué précédemment. L'identification du variant viral ayant activé le lymphocyte B naïf n'est pas toujours possible, potentiellement à cause d'une affinité de liaison trop faible. Des antigènes peuvent être développés pour leur capacité à lier de façon spécifique l'anticorps UCA avec une présentation optimale de leurs épitopes.

Afin de stimuler de façon sélective les lymphocytes B naïfs potentiellement à l'origine des anticorps neutralisants à large spectre de la famille de VRC01, un immunogène a ainsi été mis au point pour sa capacité à lier de façon spécifique l'anticorps UCA de VRC01. Grâce à cette construction multimérique dérivée de gp120 monomériques modifiées appelée eOD-GT, on a pu déterminer que les lymphocytes B naïfs qui ont les caractéristiques bien précises pour engendrer une réponse de type VRC01 à large spectre (gène VH1-2, CDRL3 de 5 résidus) sont présents dans le répertoire naïf de la majorité des personnes à un instant donné et à une fréquence d'un lymphocyte B naïf sur 400 000 environ *(Jardine, Science, 2016 ; Havenar-Daughton, Curr Opin Immunol, 2018)*, ce qui devrait permettre d'initier une réponse de type VRC01 chez la majorité des personnes immunisées.

La molécule eOD-GT8 a été testée pour l'immunisation de différents modèles animaux. Chez les souris transgéniques exprimant l'ensemble des gènes d'immunoglobuline humains, l'immunogène eOD-GT8 permet l'activation d'un lymphocyte B naïf de type VRC01 dans un tiers des souris *(Sok, Science, 2016).* Cependant, en raison de l'absence du glycane N276 dans eOD-GT8, la présentation de l'épitope ne contraint pas suffisamment l'angle d'approche pour favoriser le développement d'une réponse à large spectre *(Dosenovic, Cell, 2015 ; Sanders, Immunol Rev, 2017).*

D'autres immunogènes sont en cours d'évaluation pour leur capacité à activer spécifiquement des lymphocytes B naïfs précurseurs de lignées à large spectre ciblant la région N332 *(Fera, Nat Commun, 2018) et l'apex (Andrabi, Immunity, 2015).* De même, le trimère soluble SOSIP BG505 a dû être modifié pour lier les lymphocytes B naïfs de la plupart des anticorps neutralisants à large spectre *(Sliepen, Virology, 2015).* Ainsi, le SOSIP.v4.1-GT1 lie les précurseurs de lignées ciblant le CD4bs et l'apex *(Medina-Ramirez, Curr Opin HIV AIDS, 2017).* Un autre SOSIP modifié est capable d'amorcer une réponse humorale chez des souris exprimant le lymphocyte B naïf de la lignée de l'anticorps PGT121 qui cible la région riche en mannose *(Steichen, Immunity, 2016).*

- **Le trimère soluble comme immunogène**

L'utilisation de trimères solubles adoptant une conformation native pourrait permettre d'induire plus spécifiquement des anticorps neutralisants à large spectre. En effet, ces trimères stables adoptent la conformation pré-fusion fermée et limitent l'exposition d'épitopes immunodominants non ou peu présents sur les virus circulants comme la boucle

V3 ciblée par des anticorps neutralisants des virus hétérologues de tiers 1 et non des virus hétérologues de tiers 2 ou 3 *(Sanders, Science, 2015)*. Cependant, l'antigénicité de ces trimères solubles n'est pas parfaite et des versions améliorées du trimère soluble SOSIP *(de Taeye, Cell, 2015 ; Pauthner, Immunity, 2017 ; de Taeye, J Biol Chem, 2018)* ou l'utilisation de SOSIP lié à l'anticorps ciblant l'apex PGT145 qui bloque la boucle V3 dans une conformation où elle est cachée *(Cheng, J Virol, 2015),* permettent de réduire les réponses ciblant la boucle V3, sans cependant améliorer les autres réponses. En effet, jusqu'à présent, l'immunisation avec ces trimères a permis d'induire des anticorps neutralisants le virus à la base de la construction trimérique mais n'a pas donné lieu à l'induction de réelles réponses à large spectre. La question de l'immunodominance et de la compétition entre des réponses neutralisantes à large spectre et des réponses non neutralisantes ou non large spectre n'est donc pas tout à fait élucidée.

- **Conduire l'évolution de la lignée**

Une fois le lymphocyte B naïf activé, l'évolution de la lignée pourrait ensuite être conduite par l'administration successive de trimères différents, seuls ou en cocktails. Plusieurs stratégies sont envisagées : l'administration séquentielle de trimères de différents sous-types, ou comportant de fines différences au niveau de résidus clés pour une lignée d'anticorps neutralisants à large spectre connue, ou encore les trimères issus de l'évolution du virus autologue d'un neutraliseur d'élite.

La première stratégie a été testée en utilisant des trimères solubles de sous-types différents. Les sérums des lapins immunisés étaient capables de neutraliser les virus correspondant aux trimères de sous-types A et B administrés simultanément ou séquentiellement. Les trimères de sous-type C permettaient parfois d'améliorer la réponse contre les trimères de sous-types A et B indiquant une réactivité croisée, mais pas de vraie neutralisation hétérologue *(Klasse, Plos Pathog, 2016).* Finalement, il semble peu probable que l'utilisation de quelques trimères de sous-types variés suffise à induire des anticorps neutralisants à large spectre.

La seconde stratégie vise à conduire le développement de la lignée avec des trimères solubles contenant de fines différences au niveau de l'épitope ciblé *(Steichen, Immunity, 2016)*. Ainsi, la réponse spécifique de la région riche en mannose, initiée par un SOSIP modifié chez des souris exprimant le lymphocyte B naïf de la lignée de PGT121, a pu être stimulée par des immunisations rappels séquentielles avec deux trimères solubles SOSIP contenant une divergence décroissante avec le SOSIP BG505 sauvage (WT). Enfin, cinq SOSIP portant différentes boucles variables ont été utilisés en cocktail pour une ultime immunisation *(Escolano, Cell, 2016).* Les immunogènes rappels apportant une diversité croissante ne doivent toutefois pas créer une rupture dans la reconnaissance des anticorps, car cela mettrait un terme à la maturation de la lignée. Ainsi, le choix des immunogènes dans cette étude a été adapté au vu de l'affinité du sérum des souris mesurée par ELISA,

permettant de garantir une continuité dans la reconnaissance par les lignées en développement. La neutralisation a été détectée dès la deuxième immunisation et une activité contre des virus hétérologues de tiers 2 apparaissait au terme de la séquence d'immunisation, avec une activité toutefois moins large spectre que PGT121 *(Escolano, Cell, 2016).* La stratégie utilisant des antigènes intermédiaires s'est avérée payante alors qu'une séquence plus simple d'immunisation n'a pas permis d'atteindre le même niveau de neutralisation. L'apparition de la neutralisation suivait l'acquisition d'hypermutations somatiques, pour certaines identiques à celles des membres de la lignée PGT121. En conclusion, cette étude suggère qu'un trimère soluble modifié pour lier un lymphocyte B naïf permet d'amorcer une réponse humorale, et qu'une séquence de trimères solubles contenant une diversité directionnelle permet de conduire la lignée vers une neutralisation à large spectre.

La dernière approche vise à reproduire l'évolution des protéines d'enveloppe issues de neutraliseurs d'élite. Les clones d'*env* ont été issus des virus autologues de deux neutraliseurs d'élite dont l'un ciblait le CD4bs et l'autre ciblait le MPER *(Sather, J Virol, 2014)*. L'immunisation de lapins avec l'ADN d'*env* et les protéines trimériques correspondantes a permis l'induction d'anticorps neutralisants des virus hétérologues de tiers 1A, mais pas les virus autologues *(Malherbe, J Virol, 2014).* Le protocole d'immunisation induisant la réponse neutralisante la plus robuste utilisait des immunogènes issus des virus autologues précédant le développement de la neutralisation hétérologue à large spectre chez les donneurs. L'immunisation de macaques avec ces immunogènes permettait une neutralisation hétérologue des virus de tiers 1 et la neutralisation autologues des virus de tiers 2 dont étaient issus les immunogènes *(Hessell, J Immunol, 2016)*. De plus, une partie des anticorps ciblait les régions du CD4bs et du MPER. Ainsi, les immunogènes issus de neutraliseurs d'élite pourraient promouvoir des réponses ciblant des régions associées à la neutralisation à large spectre chez les donneurs.

- **Favoriser les hypermutations somatiques utiles**

Idéalement, les immunogènes devraient être capables d'induire l'apparition des hypermutations somatiques essentielles à l'acquisition de la neutralisation à large spectre tout en limitant les mutations redondantes inutiles à leur fonction. Par exemple, une grande partie des mutations de VRC01 ne sont pas utiles à sa neutralisation hétérologue. Au contraire, une lignée ciblant le CD4bs issue du donneur PC63 du Protocole C atteint une neutralisation hétérologue aussi large spectre avec un taux de mutations réduit *(Landais, non publié).* Ainsi, la stimulation antigénique chez ce donneur semble avoir favorisé l'acquisition des mutations essentielles et non des mutations redondantes et inutiles à la neutralisante à large spectre. Des immunogènes basés sur cette évolution pourraient éventuellement permettre une acquisition plus rapide de la neutralisation à large spectre.

▪ Vulnérabilité du bouclier de glycanes

Il semblerait que l'absence de glycanes à certaines positions du trimère permette l'induction d'anticorps de faible largeur de spectre ciblant les résidus protéiques sous-jacents *(Klasse, Plos Pathog, 2018).* Ces anticorps ne parviennent pas à neutraliser les virus qui contiennent un glycane à ces positions. Cependant, ce type de réponses pourrait constituer un point de départ pour des lignées d'anticorps à large spectre. Ainsi, la lignée de VRC01 a probablement été induite par une protéine d'enveloppe manquant les glycanes N276 et N460 et la lignée de PGT121 pourrait avoir bénéficié de l'absence du glycane N137 *(Sanders, Immunol Rev, 2017).*

L'immunisation de lapins avec des immunogènes SOSIP, basés sur les séquences des souches virales neutralisés par les intermédiaires inférés du développement de plusieurs lignées et contenant un trou de glycane à l'apex, a permis l'induction spécifique d'anticorps neutralisants dirigés contre cette région dont certains parvenaient à la neutralisation de quelques virus hétérologues de tiers 2 et certains pouvaient tolérer la restauration du glycane à une position clé de l'épitope *(Andrabi, Immunity, 2015 ; Gorman, Nat Struct Mol Biol, 2016 ; Voss, Cell Rep, 2017)*. A partir de ce premier résultat encourageant pourront être testées des stratégies d'immunisation rappels pour améliorer la réponse immunitaire et la diriger vers la neutralisation à large spectre.

▪ S'appuyer sur les réponses lymphocytaires T

Enfin, la coopération des cellules de l'immunité adaptative dans les centres germinatifs est nécessaire aux développements des anticorps d'intérêts *(Havernar-Daughton, Cell Reports, 2016).*

Ainsi, un vaccin s'appuiera certainement sur la stimulation des lymphocytes T auxiliaires qui apportent l'aide indispensable à une réponse humorale variée et efficace.

Partie 4) Les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332

La région intrinsèquement riche en mannose de la gp120, autrement appelée région N332, est la plus fréquemment ciblée par les anticorps neutralisants à large spectre *(Landais, Plos Pathog, 2016).* Les études portant sur l'isolement de nouveaux anticorps ciblant la région N332 dressent à chaque fois un portrait unique et font ressortir les disparités d'utilisation des gènes d'immunoglobulines, de structure, de mode d'interaction, d'évolution des lignées, de tolérance à la variabilité virale, etc. La grande variété de solutions trouvées pour l'acquisition d'une neutralisation à large spectre contre cette région est encourageante, puisque cela démontre une relative absence de contraintes pour le développement d'anticorps contre cette région. Cependant, il est difficile de mettre en évidence des points communs directement traduisibles en une stratégie vaccinale. Dans cette partie, nous allons décrire les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 en soulignant leurs similitudes et disparités.

A) Les caractéristiques des anticorps ciblant la région N332

▪ Isolement des anticorps ciblant la région N332

Un assez grand nombre d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 a été isolé à ce jour.

L'anticorps 2G12 est l'un des tout premiers anticorps neutralisants à large spectre isolés. Cet anticorps a été isolé par immortalisation de lymphocytes et détection par ELISA de la liaison des anticorps sécrétés à la gp120 *(Buchacher, AIDS Res Hum Retroviruses, 1994).* Sa largeur de spectre d'environ 30% est toutefois assez modeste *(Calarese, Science, 2003)*.

D'autres anticorps ciblant la région N332 ont été isolés par culture de lymphocytes B et criblage de l'activité neutralisante à partir d'échantillons de trois donneurs du protocole G d'IAVI *(Walker, Nature, 2011).* A ce jour, ces anticorps PGT121 à 123, PGT125 à 128 et PGT135 à PGT137 sont toujours les mieux étudiés et parmi les plus efficaces en largeur de spectre et affinité. PGT121 et PGT128 sont les meilleurs anticorps de leurs lignées avec plus de 70% de virus neutralisés. PGT135 est le meilleur anticorps de sa lignée, mais sa largeur de spectre est moins importante. Des membres de la lignée de PGT121, dont 10-1074, ont été isolés en utilisant un appât trimérique de gp140 YU2 *(Mouquet, PNAS, 2012).* Deux groupes génétiquement divergents l'un de l'autre et du lymphocyte B naïf sont formés par les anticorps PGT121, PGT122 et PGT123, et l'anticorps 10-1074 et ses parents clonaux proches.

D'autres anticorps neutralisants à large spectre dépendant du glycane N332 ont été isolés chez trois nouveaux donneurs du Protocole G d'IAVI. Ces anticorps PGDM ont été isolés par FACS avec une gp120 monomérique *(Sok, Immunity, 2016).* Les anticorps neutralisent environ 50% du panel de Seaman, sauf PGDM31 qui ne neutralise que 11%. Sur ce panel, la présence du glycane N332 semble absolument requise pour la neutralisation.

Deux donneurs ciblant la région N332 du Protocole C d'IAVI, PC76 et PC39, ont fait l'objet de l'isolement de lignée d'anticorps neutralisants à large spectre par FACS avec des appâts gp120 monomériques. Les données préliminaires sur la lignée PCDN issue du donneur PC76 seront décrites en détail dans la partie III. Pour le donneur PC39, une lignée de 36 anticorps a été isolée à partir des PBMC de 8 temps après infection couvrant toute la période de neutralisation hétérologue par le sérum. Les anticorps forment 4 groupes qui se distinguent par des insertions de différentes longueurs dans le CDRH1. Les anticorps manifestant la meilleure largeur de spectre (44% de virus neutralisés sur un panel de 109 virus) sont issus de temps relativement précoces dans l'acquisition de la neutralisation à large spectre.

Plusieurs lignées d'anticorps ont été isolées à partir des échantillons du donneur N170, infecté depuis plus de 10 ans, par culture de lymphocytes B et criblage *(Longo, J Virol, 2016).* Deux d'entre elles, VRC22 et VRC29, ciblent le N332 et ont des largeurs de spectre atteignant 41% de neutralisation sur un panel de virus de tiers 2. Ensemble, les anticorps isolés expliquent 50% de la neutralisation du sérum. VRC29 entre en compétition avec PGT121 et PGT128, mais pas avec PGT135 et 2G12, pour la liaison à la gp120 du virus JRFL exprimé sur des cellules. VRC22 entre en compétition avec VRC29.

BG18 est un anticorps isolé par FACS avec plusieurs appâts dont le BG505 SOSIP chez un donneur infecté depuis 3 décennies *(Freund, Sci Transl Med, 2017).* Le donneur contrôle efficacement la réplication virale depuis 10 ans grâce à ses allèles HLA B57*01 et B27*05 qui améliorent l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 *(Mendoza, J Virol, 2012).* C'est donc un contrôleur d'élite en plus d'être un neutraliseur d'élite. L'anticorps BG18 est dirigé contre la région N332 et neutralise 64% de virus avec une IC50 moyenne de 0,03 µg/mL ce qui le classe dans les meilleurs anticorps contre cette région.

La lignée DH270 a été isolée avec une stratégie originale qui utilise un glycopeptide de 30 acides aminés non continus de la boucle V3 portant des glycosylations synthétiques à neuf résidus mannose. Ce peptide représente l'épitope discontinu minimal de PGT128 *(Bonsignori, Sci Transl Med, 2017).*

La cartographie des spécificités de ces anticorps ciblant la région N332 fait ressortir des différences importantes. Ainsi, la suppression du glycane N332 et des glycanes environnants ont des effets très contrastés sur ces anticorps. Leurs usages de gènes d'immunoglobuline et les structures qu'ils adoptent sont également divers (Figure I-10 et I-11).

Lignée	Anticorps représentatif	Chaine lourde				Chaine légère			Insertions / délétions	Neutralisation hétérologue			Référence
		Gène VH	Gène JH	Mutation % nt	CDRH3 (acides aminés)	Gène VL	Gène JL	Mutation % nt	Acides aminés	% neutralisation	Virus testés	IC50 moyen	Article Isolement
PGT125-131	**PGT128**	VH4-39	JH5	19	19	VL2-8	JL2	9	+6 CDRH2 ; -5 CDRL1	72%	162	0,02	Walker, Nature, 2011
PGT135-137	**PGT135**	VH4-39	JH5	17	18	VK3-15	JK1	16	+5 CDRH1	33%	162	0,17	Walker, Nature, 2011
PGT121-123	**PGT121**	VH4-59	JH6	17	24	VL3-21	JL3	18	-7 FRL1 ; +3 FRL3	70%	162	0,03	Walker, Nature, 2011
PGT121-123	**10-1074**	VH4-59	JH6	7	20	VL3-21	JL3	5	non	66%	208	0,73	Mouquet, PNAS, 2012
	2G12	VH3-21	JH3	31%aa	13	VK1-5		15%aa	non	32%	162	2,43	Buchacher, AIDS Res Hum Retroviruses, 1994
BF520	**BF520.1**	VH1-2	JH4		20	VK3-15	JK3		non	58%	12	1,95	Simonich, Cell, 2016
VRC22	**VRC22.01**	VH4-34	JH6	7	19	VK1-17	JK1	6	-1 CDRH1 ; +5 CDRH2	24%	29	2,58	Longo, J virol, 2016
VRC29	**VRC29.03**	VH4-59	JH3	15	20	VK3-20	JK1	9	+6 CDRH2	41%	29	0,36	Longo, J virol, 2016
	PGDM11	VH3-11	JH3	20	21	VK2-24	JK1	14	-2 CDRH1	45%	106	0,41	Sok, Immunity, 2016
	PGDM21	VH3-34	JH6	22	20	VK3-20	JK5	15	+4 CDRH2	49%	106	0,1	Sok, Immunity, 2016
	PGDM31	VH1-18	JH6	15	24	VK3-20	JK3	18		11%	106	4,45	Sok, Immunity, 2016
DH270	**DH270.6**	VH1-2	JH4	12,3	20	VL2-23	JL2	11,8	non	55%	208	1,2	Bonsignori, Sci Transl Med, 2017
	BG18	VH4-4		21,2	21	VL3-25		17,7	non	64%	118	0,03	Freund, Sci Transl Med, 2017
PCDN	**33A**	VH4-34	JH5	11,6	22	VK3-20	KJ1	10,6	non	47%	110	0,53	MacLeod, Immunity, 2016
PC39	**23D**	VH4-34	JH5	14,6	22	VK3-20	KJ1	8,2	+ 11 CDRH1	44%	109	0,03	Ecriture en cours

Figure I-10 : Caractéristiques des anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332

▪ Usage des gènes d'immunoglobulines ciblant la région N332

Contrairement aux anticorps ciblant le CD4bs, une utilisation variée des gènes d'immunoglobulines aboutit à des anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 (Figure I-10). Cependant, trois usages de gènes de chaînes lourdes de familles VH4 ont été reportées à plusieurs reprises. L'utilisation du gène VH4-39 est commune aux lignées de PGT128 et PGT135, et l'utilisation de VH4-59 est commune aux lignées de PGT121 et VRC29. Ces chaînes lourdes ne sont cependant pas couplées aux mêmes chaînes légères. L'utilisation de la chaîne lourde VH4-34 a été reportée pour trois lignées d'anticorps (PC76, PC39 et VRC22). Notamment, les lignées issues des donneurs PC76 et PC39 utilisent les mêmes gènes de chaînes lourdes et légères, bien que leurs anticorps UCA et leurs évolutions soient bien distincts. Notons que les lymphocytes utilisant le gène VH4-34 ont des propriétés autoréactives et sont normalement anergiques. Le rôle de cet usage de gène et l'implication pour la vaccinologie est actuellement à l'étude dans notre équipe. Si un usage biaisé des gènes d'immunoglobulines par les anticorps ciblant la région N332 demeure incertain, leurs similitudes structurales sont bien caractérisées.

▪ Structures des anticorps ciblant la région N332

Ainsi, une ou plusieurs longues boucles CDR, souvent permises par des insertions, sont fréquentes chez les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 (Figure I-11). Leurs longueurs correspondent approximativement à l'épaisseur du bouclier de glycane, ce qui permet aux anticorps de former des liaisons avec des résidus protéiques sous-jacents et d'interagir avec plusieurs résidus sucrés des glycanes *(Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013).* Les anticorps PGT121, 10-1074 et PGT124 issus de la même lignée adoptent une structure similaire. Leurs longues boucles CDRH3 forment des feuillets bêtas antiparallèles de deux brins pénétrant dans le bouclier de glycanes. Cependant, de nombreuses différences entre PGT121 et 10-1074 modifient la surface de la cavité entre le CDRH2 et le CDRH3, ce qui contribue à leur différence de spécificité. Les anticorps PC76-33A, BG18 et DH270.6 arborent également un long CDRH3 dont l'orientation par rapport au reste de l'anticorps est plus orthogonale que chez les anticorps de la lignée PGT121. Ceci impose une orientation différente de l'anticorps par rapport au trimère d'enveloppe comme nous allons le préciser plus tard. L'anticorps PGT128 possède une boucle CDRH3 peu étendue, mais un long CDRH2 avec une insertion de 6 résidus critiques pour la neutralisation hétérologue *(Pancera, Plos One, 2013).* Chez PGT135, en plus d'une longue boucle CDRH3, la boucle CDRH1 est étendue avec une insertion de 5 acides aminés. De façon similaire, la longue boucle CDRH1 des anticorps de la lignée de PC39 semble stabiliser la boucle CDRH3 étendue. Les lignées VRC22 et VRC29 possèdent également des insertions dans leurs boucles CDRH2 similaires à PGT128 *(Longo, J Virol, 2016).*

La structure d'IgG de l'anticorps 2G12 n'est semblable à aucune autre *(Murin, J Virol, 2014)*. Ses deux chaînes lourdes interagissent en se croisant entre les régions variables et constantes. Cette structure, dite à domaine échangé, augmente la valence de l'interaction avec la gp120 et expliquerait l'exceptionnelle affinité de cet anticorps, qui n'interagit qu'avec des résidus sucrés.

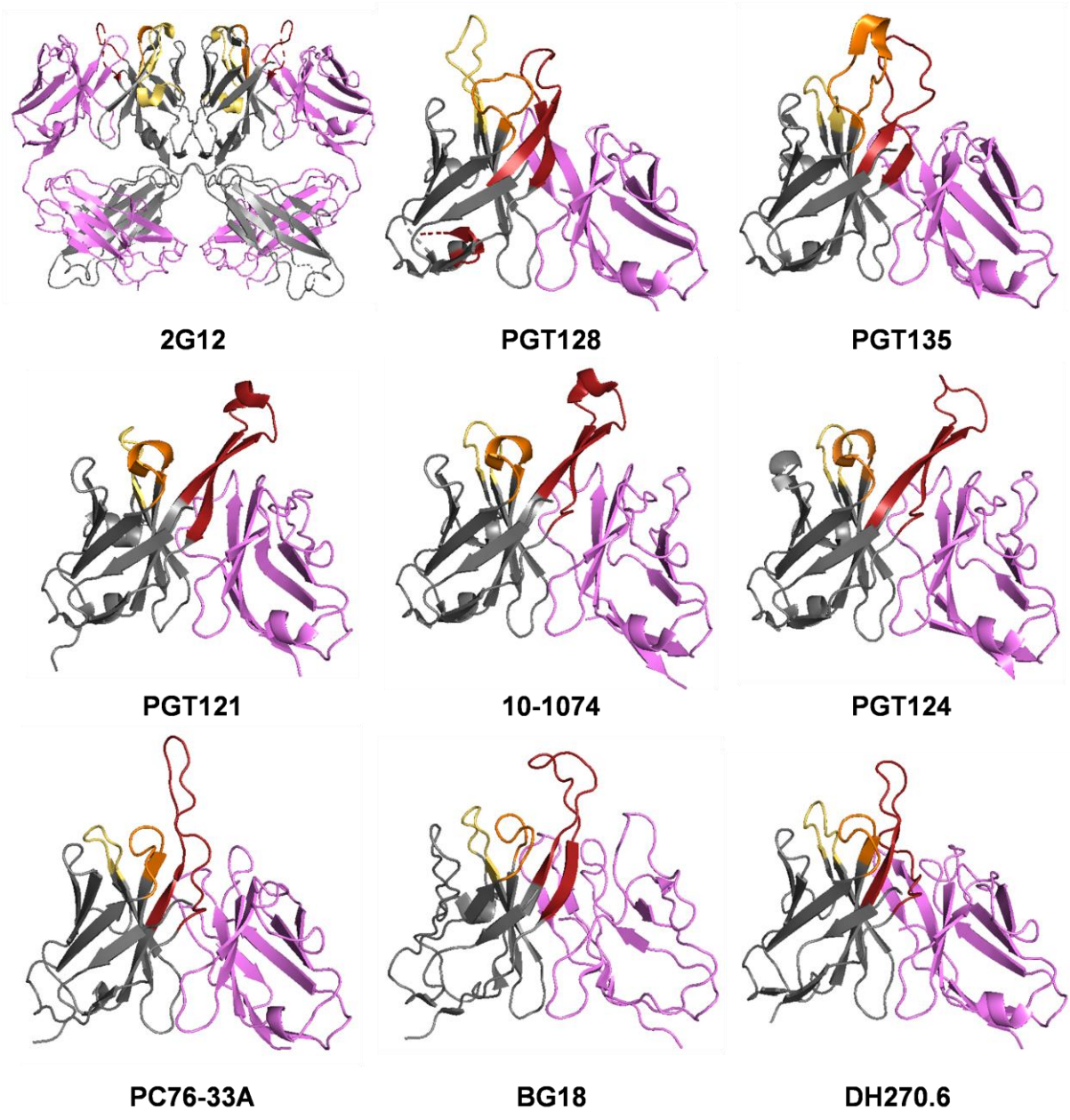


Figure I-11 : Structure des régions variables de fragments Fab d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région du patch riche en mannose sur la boucle V3 de la gp120. Les chaînes légères sont représentées en rose, les chaînes lourdes en gris, les CDRH1 en orange, les CDRH2 en jaune, les CDRH3 en rouge. La structure de 2G12 est celle d'un dimère d'IgG où les premières régions constantes des chaînes lourdes et légères sont représentées pour montrer l'échange de domaines. Structures PDB : 2G12 : 4NHG, PGT128 : 3TV3, PGT135 : 4NZR, PGT121 : 4JY4, 10-1074 : 4FQ2, PGT124 : 4R26, PC76-33A : Andrew Ward Group, non publié, BG18 : 6CH7, DH270.6 : 5TQA.

B) Les épitopes de la région N332

▪ Interactions avec le glycane N332

Une caractéristique étonnante de ces anticorps est que les glycanes ne sont pas un obstacle à la reconnaissance de la protéine d'enveloppe. Au contraire, les sucres sont ciblés par ces anticorps qui en dépendent pour leur interaction. Les anticorps ont adaptés des manières différentes de reconnaître le glycane N332. Les résidus mannoses se présentent à l'interaction par deux faces ayant des propriétés physicochimiques contrastées. Une face est polaire en interaction avec PGT128 ou PGT124 et l'autre face plus apolaire est reconnue par PGT135 (Figure I-12). Ainsi, les épitopes de PGT135 et PGT128 ne se recouvrent pas, bien qu'ils soient tous deux en interaction avec le glycane N332 et que la conformation de ce glycane soit identique dans les deux interactions *(Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013).* Cependant, PGT135 et PGT128 ont tous deux besoin d'une seconde boucle étendue pour se fixer à la protéine d'enveloppe, CDRH1 et CDRH2 respectivement.

PGT124 et PGT128 reconnaissent la même face du glycane N332 sur les branches D1 et D3. Chez PGT124, l'interaction avec le glycane N332 représente la moitié de la surface de l'épitope *(Garces, Cell, 2014).* Il est reconnu à l'interface entre la chaîne lourde et la chaîne légère dans une cavité entre la boucle CDRL2, le FRL3 et la boucle CDRH3 par des interactions de van der Waals et des liaisons hydrogènes.

PGT128 fait des contacts avec l'ensemble du sucre, formant beaucoup de contacts par des liaisons hydrogènes avec les branches D1 et D3, présentes seulement sur les sucres à 8 ou 9 mannoses *(Pejchal, Science, 2011).* Trois résidus de la boucle CDRL3 sont en contact avec un résidu mannose. Une insertion de 6 résidus dans la boucle CDRH2 promeut le contact avec les résidus mannose. Ceci est confirmé par une autre structure avec une construction du domaine externe de la gp120 et une boucle V3 raccourcie *(Mouquet, PNAS, 2012)*. Le CDRH2 et le CDRL3 de PGT128 sont en liaison avec le Man8/9 du glycane N332 et le CDRH3 contacte la base de la boucle V3. Ce mode d'interaction n'est par contre pas possible pour PGT121 et 10-1074.

Chez PGT121 et 10-1074, le glycane N332 à 8 mannoses se positionne dans une cavité formée par le CDRH3, le CDRL1 et le CDRL2. D'après la structure de PGT121 lié à un sucre, il a été estimé que l'affinité pour le sucre est de l'ordre du mM alors que l'affinité pour la gp120 est de l'ordre du nM *(Mouquet, PNAS, 2012 ; Gristick, Nat Struc Mol Biol, 2016).* La boucle CDRH3 de BG18 entre en interaction avec le glycane N332 de façon très similaire à PGT121, du fait de l'utilisation du même gène D3-3 avec une séquence consensus R-I-Y-G-V/I-I qui impose un motif structural conservé *(Barnes, Nat Commun, 2018).*

L'anticorps DH270.6 reconnaît le glycane N332 avec entre autres 4 résidus aromatiques de la boucle CDRH3 et quelques résidus de la boucle CDRL2 *(Fera, Nature Commun, 2018).*

2G12 a un mode d'interaction inhabituel avec les sucres. Il contacte avec une affinité nanomolaire, uniquement les résidus mannose terminaux d'une constellation de sucres riches en mannose, dont le glycane N332, et empêcherait l'attachement du trimère sur le corécepteur CCR5 *(Calarese, Science, 2003).*

La préférence des anticorps anti-V3 à large spectre pour une interaction avec le sucre N332 pourrait s'expliquer par la relative contrainte de flexibilité de ce sucre, car il est entouré de nombreux autres glycanes contraignant ses mouvements. Sa haute conservation parmi les souches circulantes est aussi un point clé. Le glycane N332 est présent à 73 % dans la base de données Los Alamos de plus de 30 000 séquences. Le glycane N301 est conservé à 96%. Le glycane N136 est conservé à 72%. Le glycane N295 est moins conservé, mais est tout de même présent dans 58% des séquences. La présence simultanée des glycanes N332 et N301 est très fréquente *(Sok, Sci Transl Med, 2014).* Ces glycanes du patch riche en mannose sont essentiels à la neutralisation de plusieurs anticorps ciblant cette région.

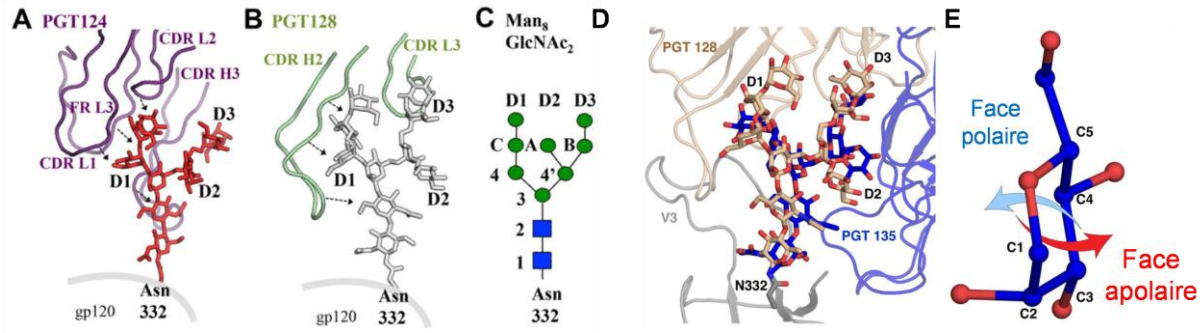


Figure I-12 : Mode d'interaction des anticorps PGT124, PGT128 et PGT135 avec le glycane N332. A) et B) Interaction de PGT124 (violet) et PGT128 (vert) avec la face polaire du glycane N332. C) Diagramme schématique du glycane $Man_8GlcNac_2$ dans l'interaction de A) et B). D) Interaction de PGT135 (violet) avec la face apolaire du glycane N332. L'interaction de PGT128 (beige) avec la face polaire est surimposée pour comparaison. E) Définition des faces polaires et apolaires d'un résidu sucré selon l'orientation des carbones. A) à C) sont issus de Garces, Cell, 2014. D) et E) sont issus de Kong, Nat Struc Mol Biol, 2013.

- **Interactions avec d'autres glycanes**

PGT124 ne reconnaît que le glycane N332 et ne dépend pas de l'interaction avec d'autres glycanes. En revanche, les autres anticorps contactent généralement un ou plusieurs autres glycanes, à différentes positions environnantes, illustrant la variété des modes de reconnaissance des glycanes de la région N332 (Figure I-13).

La structure de PGT135 lié à une gp120 monomérique *(Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013)* révèle un épitope dont la surface est constituée à 70% d'interactions avec les

glycanes. Les glycanes N332, N392 et N386 sont reconnus par les longues boucles CDRH1 et CDRH3 (18 acides aminés) qui pénètrent le bouclier de glycanes. La boucle CDRH1 entre en contact avec le glycane N386.

La structure de BG18 *(Barnes, Nat Commun, 2018)* révèle l'interaction avec le glycane N332 et des contacts additionnels avec N386 et N392 entre le CDRH2 et le CDRL3.

L'anticorps 10-1074 contacte principalement le glycane N332 et de façon minimale les glycanes N301 et N156. La conformation du FRL3 de 10-1074 dans la forme liée et non liée est modifiée par l'accommodation du glycane N301. PGT121 tolère la mutation du glycane N301. L'affinité de 10-1074 est améliorée sur les souches ne comportant pas de site de glycosylation en position 156 au contraire de PGT122 qui perd de l'activité. En effet, PGT122 fait un contact plus rapproché avec le glycane N156 avec une rotation du CDRL3 et la substitution S95R dans la chaîne légère *(Garces, Cell, 2014 ; Gristick, Nat Struc Mol Biol, 2016).* La neutralisation de PGDM12 et PGDM21 est perdue par mutations conjointes de N156 et N301 en présence de N332 et diminuée par N301A seul *(Sok, Immunity, 2016).* L'anticorps DH270.6 interagit avec le glycane N301, mais cette interaction n'est pas indispensable *(Fera, Nature commun, 2018).* PGT128 pénètre le bouclier de glycane et interagit avec deux glycanes conservés N332 et N301 *(Pejchal, Science, 2011).* Les anticorps de la lignée PC39 sont également dépendants des glycanes N332 et N301.

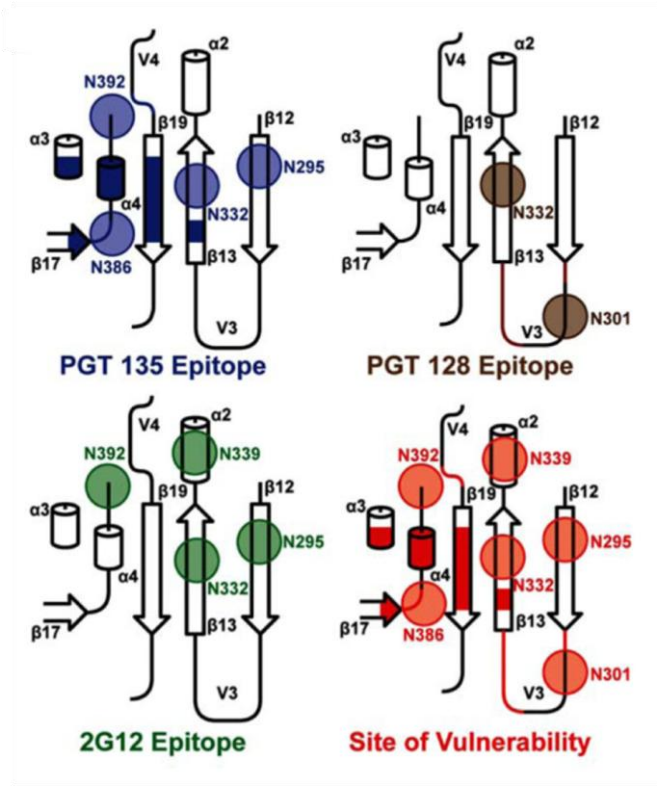


Figure I-13 : Représentation schématique des épitopes des anticorps PGT135, PGT128 et 2G12. Les hélices alpha sont indiquées par des cylindres, les brins bêta par des flèches, les boucles par des lignes et les sites de glycosylations par des cercles. Issu de Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013

- **Promiscuité d'usage des sucres pour un même anticorps**

Un anticorps neutralisant à large spectre peut parfois neutraliser des souches virales naturellement dépourvues d'un glycane cartographié comme faisant partie de son épitope. De plus, la suppression par mutagénèse de glycanes à certaines positions ne produit pas toujours des effets homogènes sur la neutralisation de différentes souches virales. Ces anticorps ont presque tous une interaction directe et préférentielle avec le glycane N332 mais ont des interactions souvent non indispensables avec les autres glycanes de leurs épitopes. Les glycanes manquant peuvent être plus ou moins substitués dans l'interaction par un glycane adjacent dans la structure. Ce mécanisme complexe, d'adaptation à la variabilité virale, est une grande force de certains anticorps ciblant le patch riche en mannose. La structure du reste de l'épitope fluctue également avec la diversité génétique et rend ce phénomène souche-dépendant, illustrant bien le problème de la reconnaissance à large spectre. L'utilisation d'associations de mutations sur plusieurs souches virales permet d'élucider en partie cette reconnaissance *(Sok, Sci Transl Med, 2014).*

Le glycane en position N334 n'est présent que dans 17% de la population virale mondiale *(Sok, Sci Transl Med, 2014).* L'introduction d'un glycane à cette position supprime le glycane N332 par perte de la séquence consensus de N-glycosylation, puisque la position 334 doit être une sérine ou une thréonine. C'est donc une mutation d'échappement facile pour les virus soumis à la pression de sélection d'anticorps neutralisants la région N332. Certains anticorps ont adapté une tolérance à ce changement subtil de la position du glycane qu'ils reconnaissent, certainement parce que leurs lignées ont été confrontées à cette mutation d'échappement par leurs virus autologues. PGT128 est capable de tolérer le changement de position du glycane N332 en N334 sur certains virus. Par contre, PGT135 en est totalement incapable et PGT121 a un degré de tolérance intermédiaire. Il en va de même pour les autres glycanes reconnus par ces anticorps.

En plus du glycane N332, PGT121 dépend principalement des glycanes N301 et N136 et une dépendance souche-spécifique est observée pour les glycanes N156 et N160 de la boucle V2 *(Sok, Sci Transl Med, 2014).* Les doubles-mutations de ces glycanes n'altèrent pas la neutralisation. Enfin, si ces glycanes des boucles V1 et V2 sont présents, PGT121 peut tolérer la mutation du glycane N332. Ceci suggère que PGT121 peut interagir avec les glycanes des boucles V1 et V2 si le glycane N332 est muté, mais qu'il ne le fait pas si le glycane privilégié N332 est présent.

Les autres anticorps manifestent également une grande promiscuité d'usage de glycanes qui sont difficiles à circonscrire puisque l'interaction avec chaque souche virale n'a pas été résolue. On peut cependant définir un degré de dépendance pour la présence d'un glycane à chaque position. Les glycanes privilégiés de PGT128 sont les glycanes N332, N295 et N301. Une dépendance souche-spécifique est observée pour le glycane N386. Par ailleurs, dans une structure en complexe, le N339 est partiellement protégé du clivage par l'EndoH ce qui suggère une interaction *(Pejchal, Science, 2011).* Les glycanes N295 et N332 semblent interchangeables. Dans certains cas, le glycane N295 est plus important que le glycane en N332. PGT135 est fortement dépendant des glycanes N332 et N392 et partiellement dépendant des glycanes N295 et N386. L'anticorps 2G12, qui contactent les résidus terminaux des glycanes, a une dépendance forte pour les positions N332, N295, N392 et une dépendance importante pour les glycanes N339 et N386.

- **Nature des glycanes reconnus**

La nature des sucres nécessaires à l'interaction est investiguée de plusieurs manières, la plus précise restant l'obtention de la structure d'un complexe avec les résidus sucrés apparaissant entiers et clairement.

La cristallisation de PGT135 en complexe avec le trimère d'enveloppe a nécessité la déglycosylation partielle par traitement avec l'EndoH, en partant du postulat que les glycanes en interaction avec PGT135 seront protégés de l'action enzymatique *(Kong, Nat*

Struct Mol Biol, 2013). PGT135 a des interactions faibles, principalement van der Waals, avec les sucres contenant entre 7 et 9 résidus mannose. PGT128 au contraire fait beaucoup de liaisons hydrogènes avec les sucres ce qui en augmente l'affinité. PGT128 se lie à $Man_8GlcNac_2$ et $Man_9GlcNac_2$ synthétiques sur puce de glycanes.

PGT121 se lie à des sucres complexes mono ou bi-anténnés terminant par un galactose ou un acide sialique comme observé sur puce de glycanes. Le traitement à la PNGase F déglycosyle partiellement la gp120 et diminue l'activité des anticorps du sous-groupe clonal de PGT121, mais pas des anticorps proches de 10-1074. Le traitement à l'Endo H clive les sucres riches en mannose, mais pas les sucres complexes et affecte la liaison des anticorps proches de 10-1074 plus que la liaison des anticorps proches de PGT121 *(Garces, Cell, 2014).* PGT121 ne se lie pas aux glycanes riches en mannose en dehors du contexte de la protéine, mais la liaison est observé sur la gp120 produite avec de la kifunensine qui produit des sucres riches en mannose *(Mouquet, PNAS, 2012).* Il semblerait donc que PGT121 peut adapter des sucres complexes et des sucres riches en mannose au site de glycosylations qui constituent son épitope.

PGDM11 à 14 se lient directement au $Man_9GlcNac_2$ et PGDM21 se lie au même sucre et aux sucres hybrides et complexes. De façon identique à PGT128, PGDM21 perd son activité sur des pseudovirus traités par NB-DNJ, puisqu'ils interagissent avec le mannose terminal sur la branche D1 *(Sok, Immunity, 2016).* Enfin, BG18 semble interagir avec les sucres riches en mannose plutôt qu'avec des sucres complexes *(Freund, Sci Transl Med, 2017).*

- **Motif GDIR**

Certains anticorps ne dépendent pas uniquement d'interactions avec les glycanes, mais contactent aussi des résidus protéiques de la base de la boucle V3, notamment le motif conservé de quatre acides aminés GDIR en amont de l'asparagine 332 entre le résidu 325 et 327.

Chez PGT124, les sérines S30 et S93 des boucles CDRL1 et CDRL3 interagissent avec l'acide aspartique D325 du motif GDIR et la tyrosine Y100 de la boucle CDRH3 fait une interaction d'empilement avec l'acide aspartique. L'interaction est complétée d'un pont salin entre l'acide glutamique E100 du CDRH3 et R327 du motif GDIR. PGT124 peut tolérer une asparagine à la place de l'acide aspartique D325, reconnaissant aussi bien le motif GDIR que le motif GNIR *(Garces, Cell, 2014).* Une partie de la boucle CDRH3 de PGT128 se replie en brin bêta contactant un petit segment de la boucle V3 par une interaction de type feuillet bêta. Les résidus I323 et R327 se lient à une cavité entre le CDRH2 et le CDRH3 *(Pejchal, Science, 2011).* Les anticorps 10-1074 et BG18 interagissent également avec le motif GDIR. Parmi les résidus de la protéine d'enveloppe nécessaires à l'interaction de DH270.6, les résidus I322 et G324 sont en interaction avec le résidu de l'anticorps R57 du CDRH2. Les

résidus N52 et D107 sont respectivement donneur et accepteur de liaisons hydrogènes avec le résidu D325 *(Fera, Nature Commun, 2018).* Des pertes de neutralisation sont aussi observées chez PGDM12 et PGDM21 pour des mutants du motif GDIR *(Sok, Immunity, 2016)* et pour les anticorps de la lignée PC39.

Ainsi, la plupart des anticorps ciblant la région N332 entre en contact avec le motif GDIR, mais cette interaction n'est pas obligatoire. En effet, PGT135 n'est pas impacté par des mutations du motif GDIR *(Sok, Immunity, 2016).*

- **Autres contacts protéiques**

Les boucles de la chaîne légères de BG18 enfourchent la boucle V1 créant des contacts supplémentaires avec les résidus protéiques *(Barnes, Nat Commun, 2018).*

PGDM12 et PGDM21 perdent leur neutralisation sur des mutants de H330 *(Sok, Immunity, 2016).* Le résidu de la protéine d'enveloppe H330 est aussi critique pour l'interaction avec PGT135. De plus, une zone d'interaction discontinue du reste de l'épitope se situe sur la boucle V4 *(Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013).* Les épitopes des anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 s'étalent ainsi sur des zones diverses des boucles V1, V2, V3 et V4 (Figure I-14).

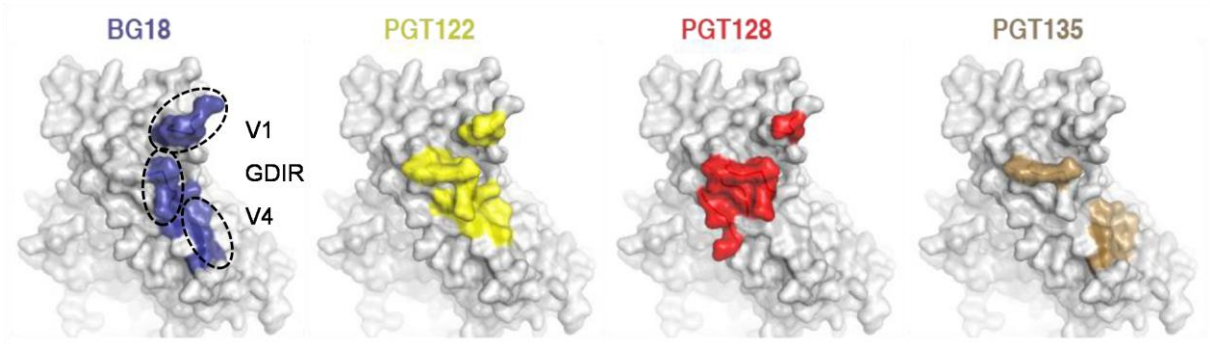


Figure I-14 : Empreintes des épitopes de BG18, PGT122, PGT128 et PGT135 sur la surface de la gp120. Les carbones de la gp120 à moins de 7 angströms des fragments Fab sont colorés. Adapté de Barnes, Nat commun, 2018.

- **Angle d'approche**

La diversité des structures des anticorps ciblant la région N332 et de leurs modes d'interaction avec la protéine d'enveloppe explique que leurs angles d'approche soient extrêmement variables (Figure I-15). Si la structure d'un complexe n'est pas disponible, une façon de s'en convaincre est d'essayer d'apparier les chaînes lourdes et légères d'anticorps de lignées différentes. Pour les anticorps ciblant le CD4bs, les combinaisons chimériques permettent le plus souvent de récapituler la neutralisation, car l'angle d'approche sur cet

épitope est très contraint et les anticorps neutralisants efficacement ont la même orientation. Une très légère différence dans l'angle d'approche des anticorps ciblant le CD4bs produit d'importantes gênes stériques et impacte drastiquement la neutralisation (VRC01 très bon neutralisant versus F105 non neutralisant). Pour les anticorps ciblant le N332, les chimères ne produisent généralement pas d'anticorps fonctionnels et neutralisants. Les modes de reconnaissance de la protéine d'enveloppe sont différents et l'angle d'approche du patch riche en mannose apparaît très libre *(Pancera, Plos One, 2013).*

L'orientation de l'anticorps dans le complexe est imposée par sa structure. Par exemple, bien que les anticorps PGT121 et BG18 aient le même mode d'interaction avec le glycane N332 avec leur boucle CDRH3, le repliement sur elle-même de la boucle CDRH3 de BG18 induit une différence d'orientation du reste de l'anticorps *(Barnes, Nat Commun, 2018)*. En revanche, PGT124 utilise le même angle d'approche que PGT122 *(Garces, Cell, 2014).* De même, l'orientation de 10-1074 et PGT121 dans le complexe est très similaire *(Gristick, Nat Struc Mol Biol, 2016).*

Les anticorps de la lignée DH270 se lient à la protéine d'enveloppe selon un angle d'approche plus horizontale qu'observé pour les autres anticorps *(Bonsignori, Sci Transl Med, 2017).*

PGT135 peut alterner son angle d'approche avec la protéine d'enveloppe. Les différents angles d'approches observés sur un même trimère peuvent être due à l'adaptation de l'anticorps à plusieurs glycoformes du trimère *(Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013).*

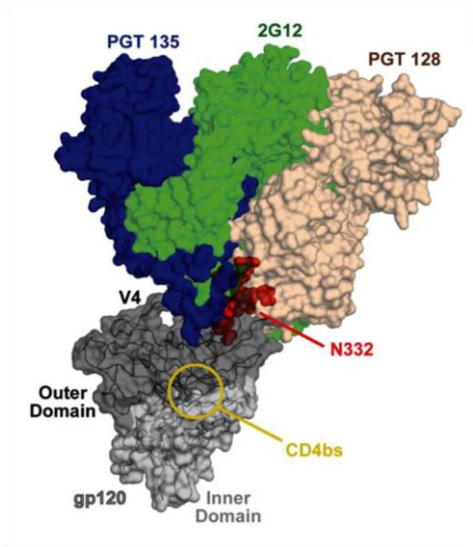


Figure I-15 : Surimposition des anticorps PGT135, 2G12 et PGT128 dans leurs interactions avec la gp120 montrant différents angles d'approche de la région N332. Issu de Kong, Nat Struct Mol Biol, 2013

▪ Longueur de la boucle V1

Dans la structure native du trimère d'enveloppe, la boucle V3 est partiellement séquestrée par les boucles V1 et V2 qui forment l'apex du trimère. Une longue boucle V1 peut interférer avec la liaison de plusieurs anticorps contre la région N332. La longueur moyenne de la V1 dans la base de données Los Alamos est de 27 résidus.

Le premier exemple de cette interférence est apporté par l'étude de la réponse neutralisante dans le sérum d'un donneur ciblant la région N332 *(Deshpande, Retrovirology, 2016).* L'activité neutralisante hétérologue du sérum semble corrélée à la longueur de la V1. De plus, les virus autologues avec une boucle V1 très longues de 27 à 41 acides aminés sont tous résistants à la neutralisation par le sérum ainsi qu'à PGT121 et PGT128. La mutation N332S et la présence d'un glycane protecteur sur la boucle V1 expliquent aussi l'échappement des virus autologues.

Le second exemple provient de l'étude de l'échappement des virus autologues d'un neutraliseur d'élite ciblant la région N332 *(van den Kerkhof, Retrovirology, 2016).* La neutralisation hétérologue est très précoce dès 8 mois post-infection (mpi) et la neutralisation autologue est forte et concomitante. Les anticorps de ce donneur n'ayant pas été isolés, l'échappement est caractérisé pour PGT135. Les virus autologues acquièrent une résistance à PGT135 entre 7 et 11 mpi sans mutations d'échappement sur l'épitope caractérisé de PGT135. Les virus autologues acquièrent une boucle V1 extrêmement longue jusqu'à 41 acides aminés entre 7 et 11 mpi. Plusieurs cystéines susceptibles de former des ponts disulfures ainsi que des glycanes apparaissent également sur la boucle V1. La modélisation d'une longue boucle V1 dans la structure du complexe de PGT135 avec un trimère montre une gêne stérique. La gêne n'est pas montrée pour l'interaction entre PGT121 et le trimère. L'élongation de la boucle V1 s'est faite malgré un coût pour la réplication virale, et elle est donc probablement arrivée à cause d'une pression de sélection par les anticorps du donneur. L'élongation de la boucle V1 peut masquer le N332 du même protomère ou du protomère adjacent. Cette longue boucle V1 semble stabilisée par les ponts disulfures, mais aussi par des mutations environnantes L133P, M148I, T188N, I181L et N139D, observée à la fois dans l'évolution du donneur et dans une culture virale sur lymphocytes T.

▪ Effets d'allostérie avec CD4 et CCR5

Le motif GDIR à la base de la boucle V3 constitue une partie du site de liaison du corécepteur CCR5. De façon cohérente, les anticorps s'appuyant sur une interaction avec GDIR neutralisent moins bien les virus à tropisme CXCR4 qu'à tropisme CCR5. L'activité de nombreux sérums est augmentée lorsqu'on retire le glycane N332. De plus, les résidus D325, R327 et H330 sont plus souvent mutés chez des virus ne possédant pas de glycane N332 ou N301. Ces glycanes cachent donc ce motif immunogénique GDIR *(Sok, Immunity, 2016).*

Les anticorps ciblant le GDIR (PGDM12, PGDM21, PGT121, PGT124, PGT128, PGT130) entrent en compétition avec le CD4 soluble, contrairement à PGT135 et 2G12 pour lesquels on n'a montré aucune influence des mutations de GDIR. Ce mécanisme de modulation allostérique de la liaison à CD4 *(Julien, Plos Pathog, 2013)* semble donc commun aux anticorps reconnaissant le motif GDIR.

C) La maturation des lignées ciblant la région N332

Les études longitudinales permettent de suivre le développement des lignées neutralisantes à large spectre. L'isolement de différents variants d'anticorps d'une même lignée permet de proposer des mécanismes de maturation.

▪ Taux de mutations nécessaire

De nombreux anticorps neutralisants à large spectre contre le VIH ont des taux d'hypermutations très élevés par rapport à la moyenne des IgG. Ceci représente un défi majeur pour la vaccination, car le taux de mutations qu'il est possible d'atteindre avec une stimulation antigénique par immunisation est limité.

L'analyse longitudinale de l'évolution d'une lignée apporte des informations précieuses sur le taux de mutations nécessaire à l'acquisition de la neutralisation hétérologue à large spectre. Si les échantillons longitudinaux ne sont pas disponibles, il est tout de même possible d'isoler des anticorps parents moins mutés au même temps après infection ou d'inverser des mutations par rapport à la séquence de référence sur IMGT.

Des intermédiaires de maturation de la lignée PGT121 ont été identifiés par séquençage nouvelle génération 454 sur le même temps après infection que celui de l'isolement de PGT121, ou inférés par analyse génétique *(Sok, Plos Pathog, 2013).* Un intermédiaire possédant 6% de mutations sur les chaînes lourde et légère neutralise 26% d'un large panel de 103 virus contre 58% pour PGT121, qui a un taux de mutations de 20%. Un intermédiaire possédant quelques mutations supplémentaires dans la chaîne lourde neutralise 48% de virus avec une réduction par 3 seulement de l'IC50. L'insertion dans la FRL3 est bénéfique à la neutralisation, mais pas absolument cruciale.

BG18 parvient à un taux de neutralisation proche de celui de PGT121 (64% contre 70%), malgré une évolution divergente à partir d'une origine proche. En effet, les lymphocytes B naïfs partagent 90% d'identité de séquence quand les anticorps matures ont 62% d'identité. BG18 ne contient pas d'insertion ou de délétion, mais un taux de mutation de BG18 plus élevé avec 21% de mutations sur la chaîne lourde contre 17% chez PGT121 *(Freund, Sci Transl Med, 2017).*

Si les anticorps neutralisants à large spectre ont souvent un taux d'hypermutations très élevé et un long CDRH3, ces propriétés ne font pas de tous les anticorps qui les possèdent de bons neutraliseurs. Par exemple, l'anticorps VRC28 du donneur N170 qui possède le plus haut taux de mutations et le plus long CDRH3 est le moins bon neutraliseur avec seulement 17 % de largueur de spectre *(Longo, J Virol, 2016).* Cet anticorps entre en compétition avec un peptide de la boucle V3 pour la neutralisation de JRCSF, comme

l'anticorps peu neutralisant 447-52D. Cette réponse dirigée contre le sommet de la boucle V3 hautement immunogénique ne permet pas d'atteindre une neutralisation intéressante.

Des anticorps neutralisants à large spectre ont été isolés chez des enfants et ont des propriétés très intéressantes du point de vue de la rapidité de leur maturation. L'anticorps BF520.1 a été isolé chez un enfant probablement infecté par allaitement dans ses premières semaines de vie *(Simonich, Cell, 2016).* L'activité neutralisante hétérologue apparaît dès 1 an contre une moyenne de 2 à 3 ans chez les adultes. Le meilleur anticorps isolé neutralise 58% d'un panel et dépend du glycane N332. L'angle d'approche observé par microscopie électronique est similaire à PGT128. L'anticorps ne neutralise pas les virus autologues transmis et précoces avant 6 mois, mais s'y lie avec affinité. Il neutralise une partie des virus autologues à partir de 6 mpi. Le taux d'hypermutations somatiques est très faible à 6,6% et sans indels. Le développement rapide d'anticorps neutralisants chez les enfants a déjà été observé sans que les facteurs permettant ce développement ne puissent être expliqués *(Goo, Nat Med, 2014).*

Par ailleurs, les lignées d'anticorps issues des donneurs PC76 et PC39 atteignent des niveaux importants de largeur de spectre avec des taux d'hypermutations limités d'environ 11,5% de nucléotides sur la chaîne lourde, ce qui nuance la nécessité de fort taux de mutations pour l'acquisition d'une neutralisation à large spectre contre la région N332.

Pour conclure sur ce point, on peut dire que la qualité des mutations hypersomatiques importe plus que leur quantité. Cependant, il est peu probable qu'un immunogène sélectionne uniquement l'apparition des mutations utiles à la neutralisation. De plus, les mutations n'ont pas toutes la même probabilité d'apparaître et ceci est inhérent à l'activité de la cytidine deaminase AID. Par exemple, pour acquérir la neutralisation à large spectre, la lignée DH270 a subit la mutation G57R sur la chaîne lourde sur un site de cytidine deaminase peu probable, mais cette mutation était essentielle *(Bonsignori, Sci Transl Med, 2017).* L'introduction de cette mutation dans l'anticorps du lymphocyte B naïf permet de détecter une liaison à la protéine d'enveloppe autologue et une neutralisation hétérologue *(Fera, Nature Commun, 2018).*

- **Nécessité d'un trimère**

Nous savons que le trimère est en partie instable et susceptible de relarguer ses sous-unités gp120. Les anticorps peuvent donc éventuellement être sélectionnés par fixation à cette forme libre de gp120 monomérique. De nombreux anticorps ciblant la région N332 dont PGT121 et PGT128 fixent aussi bien le monomère de gp120 que le trimère ce qui ne permet pas de savoir quelles formes ont dirigé leur maturation. Parmi les intermédiaires d'évolution de la lignée PGT121 *(Sok, Plos Pathog, 2013),* le premier intermédiaire a une meilleure interaction avec le trimère qu'avec le monomère, comparé à PGT121 qui n'a pas de préférence. Ceci suggère que la lignée a été induite par une stimulation antigénique dans

le contexte d'une protéine d'enveloppe native trimérique. Une préférence trimérique est aussi trouvée chez d'autres lignées d'anticorps isolées chez le donneur N170 *(Longo, J Virol, 2016),* confirmant qu'une approche vaccinale basée sur un trimère devrait être privilégiée.

- **Interaction bivalente par l'IgG**

Les anticorps peuvent augmenter la force de leurs interactions avec l'antigène par la liaison multivalente de plusieurs épitopes. Ainsi, les IgG peuvent lier deux épitopes avec leurs deux paratopes. Dans le cas du VIH, les trimères d'enveloppe étant peu nombreux et éloignés les uns des autres sur la surface du virus, les anticorps multivalents n'augmenteraient pas leurs affinités de neutralisation par rapport à un fragment Fab *(Klein, Plos Pathog, 2010).* Cependant, une amélioration de la neutralisation par l'IgG par rapport au fragment Fab a été montrée pour PGT128 et un membre de la lignée PGT121. L'épitope des anticorps ciblant la région N332 apparaît ainsi suffisamment accessible pour permettre la liaison bivalente de deux trimères d'enveloppe à la surface du virus.

Cette interaction bivalente de PGT128 avec deux trimères d'enveloppe expliquerait en partie ses très faibles IC50 *(Pejchal, Science, 2011)*. Par ailleurs, l'IgG de PGT128 diminue de plus de 10 fois la demi-vie des pseudovirus alors que le fragment Fab n'a pas d'effet. L'interaction bivalente de PGT128 semble donc compromettre la fonctionnalité des trimères d'enveloppe *(Pejchal, Science, 2011).* Contrairement à PGT121, un intermédiaire de sa lignée a une meilleure neutralisation par l'IgG que par le fragment Fab. S'il semble que les intermédiaires de la lignée utilisaient la liaison bivalente de deux protéines d'enveloppe, cette propriété n'a pas été conservée chez les anticorps matures *(Sok, Plos Pathog, 2013).*

- **Adaptation ou évitement de l'interaction avec un sucre**

L'étude de la famille clonale de PGT121 révèle que ce donneur a pu produire des variants somatiques ayant des différences très fines de spécificité, permettant de surmonter des variations dans le bouclier de glycanes du VIH. La présence du glycane N137 conduit le développement des anticorps de la famille de PGT121, avec les anticorps PGT121 et PGT123 entrant en interaction avec ce glycane et l'anticorps PGT124 l'évitant en centrant ses interactions sur le glycane N332 seul *(Garces, Immunity, 2015).* Cette évolution de PGT124 le rend plus vulnérable à une mutation d'échappement du glycane N332.

- **Contrôle viral**

Les anticorps neutralisants n'offrent généralement pas de bénéfice clinique à la personne infectée, car l'échappement viral l'emporte le plus souvent sur une neutralisation efficace par les anticorps. L'étude des anticorps, dont BG18, isolés chez un contrôleur d'élite infecté au long cours, vient nuancer ces propos *(Freund, Sci Transl Med, 2017).* Le sérum

neutralise presque tous les rares virus autologues, et ce pendant une période de 8 ans. L'analyse longitudinale des gènes de protéines d'enveloppe autologues pendant cette période montre des mutations d'échappement en N332 et au CD4bs dans un groupe de virus qui sont effectivement résistants à la neutralisation par les trois anticorps isolés chez ce donneur. Deux autres groupes de virus sont neutralisés. Ainsi, les anticorps neutralisants à large spectre ont certainement aidé au contrôle viral chez ce donneur.

- **Coopération de lignée**

Trois lignées dépendantes du glycane N332 ont été isolées chez un donneur infecté par un virus de sous-type C *(Bonsignori, Sci Transl Med, 2017).* Deux lignées neutralisent le virus autologue transmis et les virus autologues précoces, mais aucun virus hétérologue. Une lignée plus tardive DH270 apparaît 3 ans et demi après l'infection et son expansion clonale coïncide avec le développement dans le sérum d'une neutralisation hétérologue à large spectre dépendante du glycane N332. DH270 atteint 55% de neutralisation sur un très large panel de 207 virus. Les virus neutralisés contiennent quasiment exclusivement le glycane N332. Les premières lignées à neutralisation autologues ont déclenché des mutations d'échappement du virus autologue, notamment des délétions dans la boucle V1. Ces variants d'échappement sont neutralisés par la lignée neutralisante à large spectre DH270, ce qui illustre un mécanisme de coopération entre les lignées. Plus tard dans l'évolution du virus autologue, la longueur de la boucle V1 augmente à nouveau ce qui est associé à une résistance aux anticorps intermédiaires de la lignée neutralisante à large spectre DH270, mais pas de son anticorps le plus mature.

Ce mécanisme de coopération entre les lignées pourrait être très commun dans l'ontogénie des anticorps neutralisants à large spectre. En réalité, plutôt qu'une coopération, c'est l'illustration du va-et-vient constant entre l'échappement viral et la réponse humorale. Il est peu étonnant qu'un mutant d'échappement favorise l'interaction d'une autre lignée. Mais définir avec précision l'enchaînement de ces évènements reste un challenge.

D) Conclusions sur les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 et description du travail de thèse

Nous avons vu que les solutions adoptées pour la neutralisation à large spectre de la région N332 sont très diverses. Les stratégies vaccinales pour l'induction d'anticorps neutralisants à large spectre contre cette région pourraient chercher à stimuler un des lymphocytes B naïfs précurseurs de ces anticorps puis conduire la lignée vers le large spectre. Pour une telle approche, une compréhension fine de la coévolution entre anticorps et virus autologues est nécessaire pour le design des immunogènes. Par ailleurs, plutôt que de baser la stratégie sur l'histoire évolutive d'un seul neutraliseur élite, on peut imaginer des immunogènes capables d'activer et de conduire plusieurs lignées en s'appuyant sur leurs points communs. Pour cela, les protéines d'enveloppes les plus à même d'illustrer ces points communs devront être idenfiées. L'avantage serait de maximiser les chances d'aboutir à une neutralisation à large spectre chez la vaste majorité des individus vaccinés en contournant l'obstacle de l'hétérogénéité du répertoire de lymphocytes B naïfs dans la population. Cependant, la question de la compétition entre lignées ciblant le même épitope reste en partie obscure. L'étude de l'infection naturelle de différents individus est essentielle pour décrypter les phénomènes de coévolution entre lignées d'anticorps ciblant le même épitope.

Les questions concernant les caractéristiques communes des paratopes des anticorps neutralisants ciblant la région N332 sont elles aussi à investiguer pour définir avec précision les mutations productives et les mutations délétères. De cette façon, on sera en mesure d'évaluer les réponses engendrées par immunisation, et de corriger les éléments qui risquent d'empêcher la maturation des lignées vers le large spectre.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté ici se divise en deux projets basés sur l'étude de deux neutraliseurs d'élite de la cohorte du Protocole C ciblant la région N332.

La lignée PCDN a été isolée chez le donneur PC76 et a déjà fait l'objet d'un article par notre équipe que nous reprendrons en détail *(MacLeod, Immunity, 2016).* Plusieurs aspects de coévolution entre cette lignée d'anticorps et les virus autologues ont été expliqués. Cependant en l'absence de la structure d'un complexe entre un anticorps et une protéine virale autologue ou hétérologue, l'obtention de détails structuraux sur l'interaction est un objectif de nos collaborateurs des équipes d'Andrew Ward et d'Ian Wilson du Scripps Research Institute, spécialisées respectivement en cristallographie aux rayons X et microscopie électronique. De façon complémentaire, une grande partie du travail de cette thèse concerne la cartographie par mutagénèse dirigée du paratope des anticorps de cette lignée, qui s'appuie sur les structures cristallographiques des fragments Fab de plusieurs membres de la lignée. Nous cherchons à comprendre quelles sont les mutations qui ont permis l'acquisition de la neutralisation à large spectre par trois anticorps matures de la lignée. Par ailleurs, la caractérisation de l'immunogénicité des protéines d'enveloppes

autologues a pour but de faciliter le travail structural. Enfin, l'interaction entre l'anticorps du lymphocyte B naïf et une protéine d'enveloppe virale n'a pas été observée. En conséquence, nous ne savons pas exactement quelles sont les caractéristiques de la protéine d'enveloppe virale ayant induit la lignée. Pour répondre à cette question, nous avons cherché à identifier la souche virale autologue responsable de l'induction de cette lignée.

La seconde partie du travail de thèse porte sur un second neutraliseur d'élite identifié dans la cohorte du Protocole C. La neutralisation hétérologue chez ce donneur a une largeur de spectre très importante et cible la région N332. Le travail a consisté à confirmer cette cartographie de la spécificité du sérum, puis à isoler les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332. Deux lignées ont été isolées et caractérisées pour la neutralisation autologue et hétérologue ainsi que pour la spécificité pour les glycanes et résidus protéiques de la protéine d'enveloppe. L'étude de la coévolution entre ces deux lignées et les virus autologues n'est pour l'instant pas achevée, mais quelques éléments de réflexion et les perspectives pour le travail à venir seront discutés.

Enfin, l'isolement de nouvelles lignées neutralisantes à large spectre ciblant la région N332 vise à définir des comparaisons entre elles, qui pourront éventuellement permettre de développer des stratégies vaccinales induisant des réponses robustes contre cette région.

II. MATERIELS ET METHODES

Partie 1) Protocole C de l'International AIDS Vaccine Initiative

La cohorte du Protocole C organisée par l'International AIDS Vaccine Initiative (IAVI) est issue d'une cohorte d'incidence où les participants ont été régulièrement contrôlés pour la séropositivité entre 2006 et 2011. La cohorte s'étend sur 9 sites cliniques en Afrique sub-Saharienne au Kenya, Uganda, Rwanda, Zambie et Afrique du Sud, des régions où la majorité des nouvelles infections mondiales ont lieu. En moyenne, moins de 82 jours après l'exposition au VIH ayant entraîné la séroconversion, 613 personnes infectées ont été inclus dans l'étude. Elles ont ensuite été suivies régulièrement tous les 3 à 6 mois et des échantillons longitudinaux de plasma et de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été prélevés, certains donneurs étant toujours en suivi à ce jour. Les échantillons ont été collectés avec consentement écrit et les protocoles cliniques ont été approuvés par les comités éthiques appropriés.

L'activité neutralisante hétérologue a d'abord été criblée par Monogram Biosciences sur un panel de 6 virus prédictif de la neutralisation sur de plus grands panels *(Simek, J Virol, 2009).* Le score de neutralisation est calculé comme la moyenne pondérée du logarithme de la dernière dilution permettant d'atteindre 50% de neutralisation sur chaque virus. Le seuil de positivité de la neutralisation est arrêté à 50% de neutralisation à une dilution au centième du plasma. Un score de 1 est prédictif de la neutralisation d'environ 50% d'un large panel de virus. L'étude sur la neutralisation hétérologue à large spectre dans cette cohorte *(Landais, Plos pathog, 2016)* a porté sur 439 donneurs âgés de plus de 18 ans et n'ayant pas reçu de traitement antirétroviral. L'analyse d'un total de 2220 échantillons sanguins a servi à l'étude. Les corrélats cliniques de l'apparition de la neutralisation à large spectre ont été étudiés. Les régions de la protéine d'enveloppe ciblées ont été cartographiées pour les 42 meilleurs donneurs de la cohorte du Protocole C dont le score de neutralisation dépasse 1. Certains donneurs ont été sélectionnés pour des études longitudinales de la coévolution entre les anticorps neutralisants à large spectre et les protéines d'enveloppe autologues. Ainsi, des lignées d'anticorps neutralisants à large spectre ont été isolées chez le donneur PC64 ciblant l'apex *(Landais, Immunity, 2017),* le donneur PC63 ciblant l'apex *(Landais, non publié)* et chez les donneurs PC76 *(MacLeod, Immunity, 2016)* et PC39 ciblant la région N332.

Partie 2) Isolement des anticorps et clonage des gènes d'*env* autologues

▪ Tri des lymphocytes B mémoires par FACS

Les lymphocytes B mémoires issus des échantillons sanguins collectés par l'International AIDS Vaccine Initiative sont isolés et marqués par les marqueurs fluorescents couplés à des anticorps reconnaissant les marqueurs de surface cellulaires de BD Biosciences suivant : Brilliant stain buffer (BD 563794) ; CD3-Alexa Fluor 700 (BD 557943) ; CD8-Alexa Fluor 700 (BD 561453) ; CD14-PE-Cy7 (BD 561385) ; CD16-PE-Cy7 (BD 560716) ; CD19 PerCP*Cy5.5 (BD 561295) ; CD20 PerCP*Cy5.5 (BD 35095 5) ; IgG- PE-Cy5 (BD 551497) ; IgM-BV605 (BD 562977) ; IgD- BV605 (BD 563313).

Les lymphocytes B mémoires sont de plus marqués avec des gp120 marquées par des fluorochromes couplés à la streptavidine qui interagit avec la biotine intégrée au niveau des AVI-tag. La gp120 de sous-type B 92BR020 WT est marquée avec streptavidine-PE, la gp120 de sous-type C IAVIC22 WT est marquée avec streptavidine-APC (Life Technologies) et la gp120 mutante IAVIC22 N332A est marquée avec Pacific Blue BV421 (BD Biosciences).

Les cellules sont d'abord marquées par le kit de coloration des cellules mortes LIVE/DEAD Fixable Near-IR (Life Technologies) pendant 30 minutes sur la glace. Les cellules sont ensuite marquées avec les anticorps de surface couplées aux fluorochomes précités ainsi que les gp120 marquées pendant 1 heure dans le tampon Brillant Stain (BD Biosciences) sur glace. Les échantillons sont ensuite triés par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) sur le trieur BD FACSAria III. Les lymphocytes B mémoires doublement positifs pour la fluorescence des gp120 WT sont distribués dans des plaques 96 puits à raison d'une cellule par puits dans un tampon de lyse contenant le First Strand Superscript III (Life Technologies), du DTT, de la RNAse inhibitor (Life Technologies) et du détergent NP40.

▪ Amplification des gènes d'immunoglobulines sur cellule unique

Une librairie d'ADN complémentaires est générée à partir de chaque cellule triée dans le tampon de lyse par la Superscript III RTase (Invitrogen) et des amorces de 6 nucléotides aléatoires (Random Hexamers Gene Link) en suivant le programme de thermocycleur suivant : 10 min 42°C, 10 min 25°C, 60 min 50°C, 5 min 94 °C. Puis, les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines lambda et kappa sont amplifiées par deux PCR successives dans des plaques 96 puits distinctes pour chaque chaîne. Le Multiplex PCR Kit (Quiagen) et un mélange d'amorces mis au point par Tiller et al sont utilisés *(Tiller, J Immunol Methods, 2008).* L'amplification des régions variables nécessite le mélange de 4 amorces sens pour la chaîne lourde, 7 amorces sens pour la chaîne légère lambda, 3 amorces

sens pour la chaîne légère kappa et 1 amorces antisens pour chaque chaînes. Pour chaque puits, 12,5 µL de master mix d'enzyme, 0,5 µL de chaque mélange d'amorces sens et antisens, 9 µL d'eau et 2,5 µL du produit d'amplification de l'étape précédente sont mélangés puis suivent le cycle suivant : 5 min 94°C, 50 x (30 s 94°C, 30s 58°C, 1 min 72°C) 1 min 72°C. La présence d'un fragment d'ADN amplifié est contrôlée sur gel d'agarose E-gel 96 puits (Qiagen). Les fragments PCR des régions variables de chaînes lourdes et légères sont séquencés par Eurofins et analysés à l'aide de l'outil en ligne V-quest de IMGT (the International ImMunoGeneTics Information System) *(Giudicelli, Cold Spring Harb Protoc, 2011 ; Lefranc, Nucleic Acids Res, 2009)* qui permet d'assigner la famille d'immunoglobulines utilisées par chacun des lymphocytes B mémoires triés.

- **Clonage des gènes d'immunoglobulines dans les vecteurs d'expression plasmidiques**

Les anticorps d'intérêt sont clonés dans les vecteurs d'expression contenant les parties constantes des différentes chaînes d'immunoglobulines *(Tiller, J Immunol Methods, 2008).* Les plasmides sont ouverts par digestion avec des enzymes de restriction (NEB). Les extrémités sont déphosphorylées par Antartica Phosphatase (NEB) et les plasmides ouverts sont purifiés sur gel d'agarose (Qiagen). Une dernière amplification PCR des fragments avec des amorces contenant une homologie de séquences aux extrémités avec les vecteurs d'expression plasmidiques permet le clonage par Seamless Cloning (Life Technologies) suivant le mélange suivant : 1,2 µL de vecteur ouvert à 50 ng/µL, 1 µL de fragment PCR à 10 ng/µL, 5 µL d'enzyme Seamless, quantité suffisante d'eau pour 10 µL. Après incubation à température ambiante pendant 15 min, incubation sur glace pendant 2 min, 20 µL de bactéries compétentes DH5alpha sont ajoutées et transformées. L'intégralité des bactéries est étalée sur LB agar ampicilline. Trois à cinq colonies sont séquencées par Sanger.

- **Identification et clonage des gènes de protéines d'enveloppe**

Les gènes de protéines d'enveloppe autologues des donneurs ont été initialement séquencés par Monogram Biosciences à partir des échantillons longitudinaux de sérum. Des gènes représentatifs de chaque temps après infection et sélectionnés pour leur diversité ont ensuite été synthétisé par GeneArt (Life Technologies) sous forme de fragments d'ADN double brin puis cloné dans un vecteur plasmidique d'expression en cellules humaines pcDNA3.1 selon la même méthode que pour les anticorps.

- **Amplification d'ADN plasmidique**

Les bactéries compétentes sont produites par traitement chimique à partir d'un stock de DH5alpha commerciales (Thermo Fisher Scientific). Une préculture sur la nuit sert à

ensemencer 100 mL de LB pour atteindre une DO à 600 nm de 0,1. Lorsque la DO atteint 0,5 à 0,6, les bactéries sont centrifugées à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C et resuspendues dans 20 mL de $MgCl_2$ 100mM sur la glace. Après 30 min d'incubation, les bactéries sont à nouveau centrifugées et resuspendues dans 2 mL de $CaCl_2$ 100mM glycérol 15 % puis aliquotées et congelées. Entre 20 et 50µL de bactéries compétentes sont transformées avec 1 µL d'ADN par choc thermique à 42°C pendant 45 s puis resuspendues dans 200µL de LB, incubées 1 heure avec agitation et étalées sur boite de LB agar contenant 50 µg/mL d'ampiciline ou de kanamycine selon la résistance du plasmide. Les colonies sont utilisées pour ensemencer 5 mL de LB avec antibiotique pour purification Miniprep (Qiagen) ou ensemencement de 200 mL de LB avec antibiotique pour purification Maxiprep (Qiagen). Les concentrations d'ADN des préparations sont déterminées par absorbance à 260 nm. Les séquences des ADN amplifiés sont systématiquement contrôlées par séquençage Sanger (Eurofins ou Genewiz).

- **Mutagénèse dirigée des anticorps et des gènes de protéines d'enveloppe**

Les mutations de résidus protéiques de gènes d'immunoglobulines ou de protéines d'enveloppe sont obtenues par amplification PCR des plasmides avec des amorces sens et anti-sens contenant la mutation désirée. Les composants de la réaction et les cycles de PCR ont souvent dû être optimisés pour obtenir une amplification. Nous allons donner un protocole classique. Pour une réaction de 50µL, on mélange entre 50 et 200 ng d'ADN plasmidique, 0,2 à 0,5 µM de chacune des amorces, 0 à 10% de DMSO et 50 % de Master Mix 2X d'ADN polymérase Phusion High-Fidelity avec tampon GC (Thermo Scientific). Après une dénaturation initiale à 98°C de 30 s à 5 min, le cycle suivant est répété entre 20 et 40 fois : dénaturation de 30 s à 98°C ; hybridation à diverse température entre 30 et 45 s ; élongation à 72°C typiquement de 3 à 5 min. La présence d'une amplification est contrôlée sur gel d'agarose E-gel (Thermo Fisher). L'ADN matrice qui contient des méthylations est digéré par 1 µL de DpnI pendant 1h à 37°C (NEB). Puis des bactéries compétentes DH5alpha sont transformées avec 1 à 2 µL de la réaction selon le protocole ci-dessus. Entre 2 et 5 colonies sont prélevées et cultivées dans 5 mL de LB. L'ADN est ensuite purifié avec le kit miniprep (Qiagen) et séquencé par méthode Sanger (Eurofins ou Genewiz).

Partie 3) Production des anticorps monoclonaux et des pseudovirus et test de neutralisation

▪ Culture des lignées cellulaires humaines stables

Les cellules humaines embryoniques de reins HEK293 sont très utilisées pour l'expression de protéines humaines, car elles permettent les modifications post-traductionnelles au plus proche des modifications in-vivo. Elles se déclinent en plusieurs lignées adhérentes ou adaptées à la culture en suspension.

Les cellules HEK293T expriment un mutant de l'antigène SV40 permettant l'immortalité de la lignée et sont adhérentes. Elles sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum fœtal de veau, de la pénicilline et streptomycine (Gibco 100X) qui préviennent la prolifération bactérienne et du pyruvate de sodium. Les cellules sont maintenues en culture monocouche par passage tous les 3 à 4 jours à 5 millions de cellules pour 225 cm^2 de culture dans 50 mL de milieu DMEM supplémenté. Les cellules sont trypsinisées par 5 mL de Tryspine EDTA 0,25% pour les décoller du plastique, puis resuspendues dans du milieu DMEM et comptées manuellement sur une cellule de Malassez ou automatiquement par Countless II (Thermo Fisher Scientific). Elles sont ensuite distribuées dans des flasques de tailles différentes de façon à être à environ 70% de confluence le lendemain pour la transfection.

Les cellules HEK293F sont une lignée stable adaptée pour la culture en suspension et dans un milieu Freestyle (GIBCO) dépourvu de sérum.

Les cellules HEK293S ont été modifiées génétiquement pour déléter le gène de l'enzyme N-acétylglucosaminyltransferase I (GnTI) *(voir Partie 1 de l'introduction)*. Il en existe une lignée adhérente cultivée en milieu DMEM supplémenté et une lignée adaptée à la culture en suspension dans le milieu Freestyle.

Les cellules TZM-bl sont dérivées de cellule HeLa modifiées génétiquement pour exprimer le récepteur de VIH-1 CD4 et le co-recepteur CCR5 et un gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de VIH-1 Tat. Cette lignée adhérente et cultivée en milieu DMEM supplémenté est donc permissive à l'infection par les VIH et les pseudovirus produits en cellules humaines. Lorsqu'elles sont infectées, les TZM-bl produisent la protéine virale Tat qui active la production de l'enzyme luciférase. Cette dernière catalyse l'oxydation de la luciférine en produisant une lumière jaune.

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C et 5% de C02. Les cultures en suspension sont agitées à 130 rpm dans un volume compris entre un tiers et la moitié du volume total de la flasque.

▪ Transfection des lignées cellulaires humaines stables

La transfection des lignées cellulaires humaines stables HEK293 permet la production des IgG recombinants et des pseudovirus utilisés ensuite en test de neutralisation et des gp120 monomériques recombinantes utilisées en test ELISA. Les cultures cellulaires en suspension sont transfectées à 1,2 millions de cellules par mL et les cultures adhérentes à environ 70 % de confluence. Pour la transfection, les plasmides sont mélangés dans un milieu OptiMEM (GIBCO) réduit en sérum. Pour les cultures en milieu Freestyle non supplémenté en antibiotiques, le mélange contenant l'ADN doit être filtré sur membrane PVDF 0,22 µm (Merck Millipore). Dans un autre tube, le transfectant 293Fectin (Thermo Fisher) ou Fugene (Promega) est mélangé à un volume identique d'OptiMEM. Puis le mélange contenant l'ADN est ajouté au mélange contenant le transfectant. Le tout est incubé 30 min à température ambiante puis ajouté aux cellules. Les quantités d'ADN, de plasmides, d'OptiMEM et de transfectant sont indiquées dans le tableau ci-dessous pour des volumes de culture traditionnels. Ces quantités peuvent être adaptées proportionnellement pour des volumes de culture différents. Dernièrement dans notre laboratoire, des transfectants de Oz Bioscience Hype293 et Helix-IN ont été utilisés alternativement en utilisant les mêmes quantités de chaque réactif.

Protocoles de transfection							
Produit	**Lignée**	**Volume culture**	**Plasmide 1**	**Plasmide 2**	**OptiMEM**	**Transfectant**	**Récolte**
IgG	adhérente	2 mL	3 µg HC	3 µg LC	2 x 100 µL	18 µL Fugene	72 h
IgG	suspension	50 mL	12,5 µg HC	12,5 µg LC	2 x 1 mL	50 µL 293Fectin	48 – 96 h
gp120	suspension	1 L	~ 400 µg	X	2 x 25 mL	0,8 mL 293Fectin	72 – 120 h
Pseudovirus	adhérente	2 mL	2 µg env	4 µg pSG3	2 x 100 µL	18 µL Fugene	72 h
Pseudovirus	adhérente	10 mL	5 µg env	10 µg pSG3	2 x 200 µL	50 µL Fugene	72 h

▪ Expression d'anticorps monoclonaux et titration pour un criblage rapide

L'expression d'anticorps monoclonaux pour un criblage rapide de leur activité neutralisante est possible par co-transfection de cellules adhérentes HEK293T avec les plasmides contenant les gènes de chaînes lourdes et légères. Les surnageants de cultures sont récoltés à 72 heures après tranfection et ne sont pas purifiés.

La concentration d'IgG dans le surnageant est déterminée par titration ELISA. Pour ce faire, 50µL à 5 µg/mL dans du PBS 1X pH 7,4 de l'anticorps de chèvre non conjugué anti-Fc humain est attaché au plastique de plaque NUNC MaxiSorp sur la nuit à 4°C. Les plaques sont lavées au PBS 0,05% Tween 20 et agitées à température ambiante pour les étapes suivantes. Les puits sont bloqués par 3% de BSA dans du PBS. Après lavage, 50 µL de dilutions en série dans du PBS 1X 1% BSA, d'anticorps monoclonaux de concentrations connues ainsi que des dilutions en série des surnageant d'expression HEK293T, sont incubés 1 heure. Après lavage, les anticorps fixés sont relevés par l'anticorps secondaire de chèvre anti-F(ab')2 humain couplé à l'alcaline phosphatase dilué au 1/1000 dans du PBS 1X 1% BSA incubé une heure, puis lavé avant ajout de substrat peroxydase qui permet la lecture de l'absorbance à 405 nm. Les concentrations des IgG sont déterminées par rapport à la courbe standard d'anticorps de concentration connue et sont généralement faibles, entre 10 et 20 µg/mL.

- **Expression et purification d'anticorps monoclonaux en grande quantité**

L'expression d'anticorps monoclonaux en quantité plus importante est réalisée par co-transfection de cellules HEK293F en suspension avec les plasmides de chaînes lourdes et légères suivant les quantités d'ADN, de transfectant et d'OptIMEM indiquées dans le tableau « Transfection des lignées cellulaires humaines stables ». Deux à quatre jours après transfection, le surnageant est collecté par centrifugation à 2400 rpm pendant 10 min et filtré à 0,22 µm. Le surnageant est chargé sur colonne de Protéine A Sepharose Fast Flow (GE) pré-équilibrée en PBS 1X pH 7,4, puis lavé par 10 volumes du même tampon et 10 volumes de PBS 1X pH 7,4 0,5 M NaCl. Les IgG sont élués par 20 volumes de 0,1 M glycine pH 2,5. Le pH de l'éluat est neutralisé par l'ajout de 1M Tris pH 9 puis le tampon est échangé sur Amicon MWCO 30 kDa (Millipore) par 4 dilutions de 1 mL de protéine concentrée dans 15 mL de tampon PBS 1X pH 7,4. La concentration est définie par absorbance à 280nm en utilisant un coefficient d'extinction déterminé par Expasy ProParam.

- **Production de pseudovirus**

Les pseudovirus de VIH-1 sont produits par co-transfection de cellules humaines HEK293T avec un plasmide *pSG3ΔEnv*et un plasmide codant pour la protéine d'enveloppe entière. Le plasmide *pSG3ΔEnv* code pour l'intégralité du génome de VIH-1 et permet l'expression et la sécrétion de virions réplicatifs, mais dépourvu de protéine d'enveloppe, le gène *env* étant rendu inactif par l'insertion de quatre nucléotides et d'un codon stop. Les gènes de protéine d'enveloppe sont synthétisés sous forme de fragments d'ADN double brin et leurs séquences subissent une optimisation pour l'usage des codons en cellules humaines. Les fragments sont incorporés dans un plasmide PCDNA3.1+ permettant l'expansion en bactérie *E. coli* sous la sélection ampicilline.

La cotransfection permet la production de virions incorporant la protéine d'enveloppe et capable d'un cycle de réplication dans les cellules TZM-bl. Les virions produits par cette infection sont dépourvus de protéine d'enveloppe et ne peuvent faire un autre cycle de réplication. Les cellules adhérentes HEK293T sont cotransfectées suivant les quantités d'ADN, de transfectant et d'OptIMEM indiquées dans le tableau « Transfection des lignées cellulaires humaines stables ». Le surnageant de culture est récoltés 48 à 96 heures après transfection. Il peut être utilisé directement en test de neutralisation, mais il est plus généralement aliquoté, congelé et titré pour déterminer la dilution à utiliser pour obtenir entre 100 000 et 500 000 unités relatives de lumière dans l'infection de TZM-bl.

- **Production de pseudovirus avec des sucres modifiés**

L'ajout d'inhibiteur de glycosidase lors de la co-transfection de cellules HEK293T permet la modification des sucres exprimés à la surface de la protéine d'enveloppe. La kifunensine est ajoutée à une concentration finale de 25 µM et bloque la synthèse des sucres à $Man_8GlcNac_2$ ou $Man_9GlcNac_2$. La swainsonine est ajoutée à une concentration finale de 20 µM et empêche la processivité vers des sucres complexes. Enfin, les pseudovirus peuvent être exprimés en cellules HEK293S qui sont modifiées pour inactiver le gène de l'enzyme GntI. L'absence de cette enzyme bloque la processivité des sucres à $Man_5GlcNac_2$

- **Test de neutralisation**

Les cellules TZM-bl sont distribuées dans des plaques 96 puits à fond transparent plat (COSTAR 3688) dans 50 µL de DMEM supplémenté à 0,2 million de cellules par mL le jour précédent la neutralisation. Les anticorps monoclonaux purifiés ou issus d'échantillons de sérum sont dilués en série dans du DMEM supplémenté et 8 µL sont distribués dans chaque puits d'une plaque de mélange à l'exception d'une ligne qui ne contient que du DMEM supplémenté. Les pseudovirus frais ou décongelés sont dilués dans du DMEM supplémenté de façon à obtenir un titre en l'absence d'anticorps de 100 000 à 500 000 unités relatives de lumière selon le test de titration réalisé précédemment. Le bruit de fond pour des cellules seules ou des cellules en présence d'un anticorps neutralisants à 100% est d'environ 10 000 unités relatives de lumière. 24 µL de pseudovirus dilués sont ajoutés à chaque puits de la plaque de mélange et incubé 1 heure à 37°C. Le surnageant de culture des cellules TZM-bl est aspiré et 25 µL du mélange anticorps/pseudovirus sont ajoutés aux cellules. Après 24 heures d'incubation à 37°C, 75 µL de DMEM supplémenté sont ajoutés pour assurer la survie des cellules. Après 48 heures, le surnageant des cellules est aspiré. 45 µL de tampon de lyse sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont agitées vigoureusement pendant 1 à 2 heures. 30 µL de tampon de luciférase (Oz Biosciences) sont ajoutés et la lumière émise est lue sur un lecteur de plaque Tecan.

Le pourcentage de neutralisation à chaque dilution d'anticorps ou de sérum est calculé comme suit :

(« Virus seul » – « Virus + Anticorps ») / « Virus seul » x 100

L'IC50 (inhibitory concentration 50) est défini comme la concentration d'anticorps nécessaire pour atteindre 50 % de neutralisation. L'ID50 (inhibitory dilution 50) est utilisée pour le sérum de concentration en IgG inconnue et se définit comme la dilution du sérum pour atteindre 50 % de neutralisation. Ces valeurs sont déterminées par régression linéaire sur la partie linéaire de la courbe sigmoïdale, entre les plateaux aux alentours de 0 % et aux alentours de 100 % de neutralisation qui sont atteint à faibles et à hautes concentrations d'anticorps respectivement.

Les rapports d'IC50 ne sont considérés comme significatifs que s'ils dépassent un facteur 2 ou 5. La neutralisation sur cellules TZM-bl a grandement amélioré l'évaluation des anticorps, car c'est une expérience très reproductible. Cependant, la variation inter-expérience des IC50 est bien réelle et peut atteindre près d'un ordre de grandeur *(Sarzotti-Kelsoe, J Immunol Methods, 2014).*

Partie 4) Purification des gp120 recombinantes

▪ Expression et purification de gp120 recombinantes

Les gp120 recombinantes peuvent être utilisées en test ELISA et pour l'isolement de lymphocytes B par FACS. Dans ce cas, le fluorochrome couplé à la streptavidine et lié à la gp120 au niveau de la biotine spécifiquement intégrée au niveau d'un tag AVI (Avidity).

Les constructions de gp120 tronquées par insertion par mutagénèse dirigée d'un codon stop au résidu 511 et contenant un tag AVI (Avidity) permettant la biotinylation spécifique par l'enzyme BirA et/ou un tag poly-histidine sont insérés dans le plasmide PCDNA3.1+. Le plasmide est transfecté dans 1 L de cultures en suspension HEK293F ou HEK293S suivant les quantités d'ADN, de transfectant et d'OptIMEM indiquées dans le tableau « Transfection des lignées cellulaires humaines stables ». Le surnageant de culture est récolté par centrifugation à 4000 rpm pendant 20 min au troisième à cinquième jour après transfection. Le surnageant est filtré à 0,22 µm, supplémenté par 5 tablettes d'inhibiteurs de protéase Complete (Roche) puis chargé sur la nuit à 4°C sur une colonne de 5 mL de résine de chromatographie d'affinité avec les sucres mannoses Lectine Sepharose issue de l'espèce bactérienne Galanthus nivalis (Vector Labs). La colonne est lavée avec 20 volumes de PBS 1X pH 7,4 puis 5 volumes de PBS 1X pH7,4 0,5 M NaCl. La gp120 est éluée par 5 volumes de 1 M α-D-méthylmannopyranoside dans PBS 1X pH 7,4 puis concentré à moins de 3 mL sur Amicon MWCO 30 kDa (Millipore). La protéine concentrée est chargée sur une colonne d'exclusion de taille Superdex S200 16/600 (GE) dans un tampon PBS 1X pH 7,4. Les dimères et monomères de gp120 s'éluent en deux pics plus ou moins résolus et en proportion variant selon la construction. Les fractions correspondant aux monomères purs sont concentrées sur Amicon MWCO 30 kDa. Les fractions contenant les dimères et des monomères non séparés sont également concentrées et conservées à – 20 °C.

La biotinylation des gp120 par la technologie Avidity fait appel au tag AVI de quinze acides aminés (GLNDIFEAQKIEWHE) qui est spécifiquement reconnus par la biotine ligase BirA. La gp120 à biotinyler est diluée à 40 µM dans 10 mM Tris pH 8,0 avec 1/10 tampon Biomix A et 1/10 tampon Biomix B et 2,5 µg de BirA pour 10 nmol de gp120. Le mélange est incubé 2 heures à 37°C puis injecté sur une colonne d'exclusion de taille Superdex S200 Increase 10/300 GL (GE) afin de séparer les différents composants du mélange de la gp120 biotinylée.

L'efficacité de la biotinylation est déterminée par incubation de 5 µg de gp120 biotinylée avec des billes NeutrAvidin (Thermo) incubée au moins 2h à température ambiante et sous agitation. La fraction non retenue donc non biotinylée est collectée ainsi que la fraction retenue biotinylée qui est dissociée des billes par chauffage à 100°C dans du tampon Laemmli. Les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE et l'intensité des

bandes permet une approximation de la proportion de gp120 biotinylée qui approche généralement de 50%. Pour ces calculs, le poids moléculaire de la gp120 est considéré sans prendre en compte les sucres dont la masse ne peut être déterminée précisément et est variable du fait de l'hétérogénéité des N-glycanes.

- **Test de liaison aux gp120 par ELISA**

La gp120 monomérique ou dimérique est attachée aux plaques 96 puits MaxiSorb (NUNC) entre 2 et 10 µg/mL sur la nuit à 4°C. Après lavage en PBS 1X 0,05 % Tween 20 et blocage pendant une heure avec PBS 1X 3% BSA, des dilutions en série d'anticorps dans du PBS 1X 1% BSA sont distribuées et incubées une heure à température ambiante. Après lavage au PBS 1X 0,05 % Tween 20, les anticorps fixés sont révélés par l'anticorps secondaire de chèvre anti-F(ab')2 humain couplé à l'alcaline phosphatase. L'anticorps secondaire est dilué au 1/1000 dans du PBS 1X 1% BSA, incubé une heure, lavé au PBS 1X 0,05% Tween avant ajout de substrat peroxydase qui permet la lecture de l'absorbance à 405 nm. Alternativement, l'anticorps secondaire utilisé peut être couplé à la péroxidase HRP qui est révélé par le substrat TMB qui permet la lecture de l'absorbance à 450 nm. Dans ce cas, l'absorbance à 550 nm est aussi mesurée et soustraite à la mesure de 450 nm.

I. .

III. TRAVAUX SUR LE DONNEUR PC76

Partie 1) Informations préliminaires sur la lignée PCDN

Les données qui sont détaillées dans cette partie sont issues de l'article de notre groupe paru en 2016 dans Immunity et écrit par Daniel MacLeod et Nancy Choi au Scripps Research Institute *(MacLeod, Immunity, 2016).*

- **Activité neutralisante du sérum**

L'activité neutralisante du sérum de PC76 a été testée entre 5 et 38 mois post-infection (mpi) sur un panel de 37 virus de sous-type variés (Figure III-1). L'activité neutralisante hétérologue a été observée dès 5 mpi et atteignait 68% de virus neutralisés à 33 mpi, principalement sur les virus de sous-type B et C. L'activité neutralisante était diminuée par la mutation N332A sur la majorité des virus testés. De plus, l'effet de la mutation N332A sur la neutralisation du virus 92BR020 de sous-type B était constant, de l'apparition de la neutralisation de ce virus à 28 mpi jusqu'à 50 mpi. Dans une expérience de déplétion, le sérum de 33 mpi a été adsorbé sur la gp120 recombinante 92BR020 WT et la gp120 recombinante 92BR020 N332A ainsi que sur la gp120 recombinante de sous-type C IAVIC22 WT. Le sérum déplété des anticorps se fixant sur l'une ou l'autre des deux gp120 WT perdait l'activité neutralisante sur 8 virus testés tandis que l'activité neutralisante du sérum adsorbé sur la gp120 N332A était comparable au sérum non déplété.

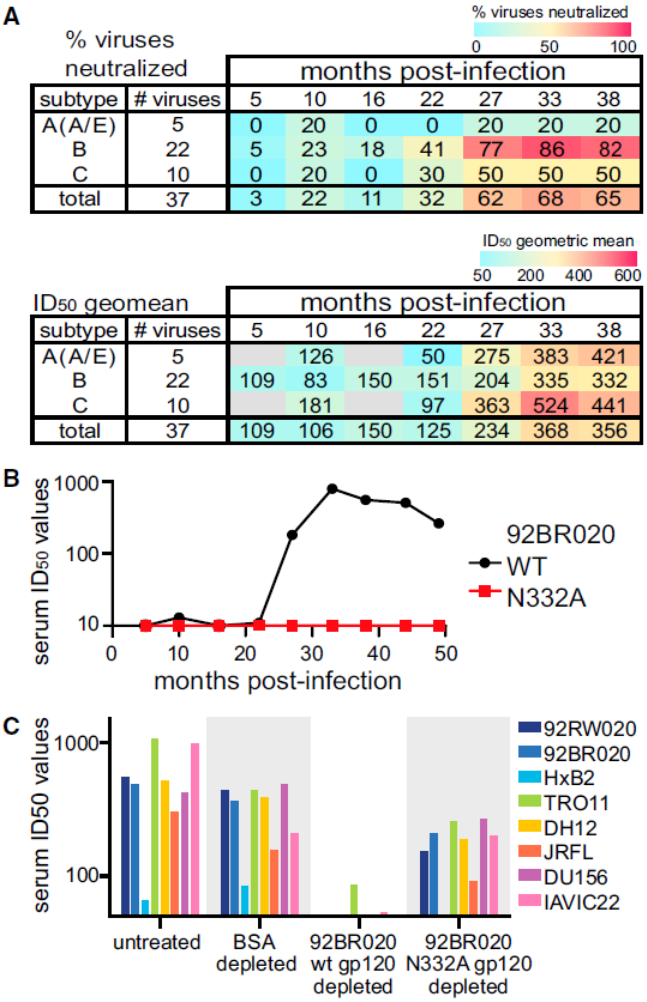


Figure III-1 : Données préliminaires sur l'activité neutralisante du sérum du donneur PC76. A) Neutralisation par le sérum de différents temps après infection du panel de 37 virus. Le pourcentage de virus neutralisés au sein de chaque sous-type est indiqué en haut et les ID50 moyennes sont indiqués en bas. B) Neutralisation par le sérum des pseudovirus 92BR020 WT et 92BR020 N332A au cours de l'infection. C) Neutralisation des 8 pseudovirus listés à droite par le sérum déplété par adsorption à la protéine indiquée en abscisse. Untreated et BSA depleted sont des contrôles.

Ensemble, ces données confirmaient que l'activité neutralisante à large spectre chez ce donneur était liée à des anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 et suggéraient que les appâts gp120 recombinantes 92BR020 et IAVIC22 étaient adaptées à l'isolement des anticorps neutralisants à large spectre par tri des lymphocytes B mémoires du donneur PC76.

- **Isolement des anticorps**

Pour isoler ces anticorps, la stratégie de tri des lymphocytes B mémoires par FACS à partir des échantillons sanguins du donneur s'est appuyée sur le marquage fluorescent de gp120 recombinantes IAVIC22 WT, 92BR020 WT et 92BR020 N332A. L'utilisation de deux

gp120 recombinantes WT de sous-types différents permet d'exclure les anticorps non spécifiques ou se liant à la gp120 de façon souche-dépendante et l'utilisation du mutant N332A permet de trier spécifiquement les anticorps spécifiques de la région N332. Les lymphocytes B mémoires N332-spécifiques ont été triés pour l'amplification PCR des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines sur cellules uniques.

L'analyse des séquences a permis l'identification d'une lignée d'anticorps appelée PCDN. Elle comprenait 12 anticorps monoclonaux parents, isolés à partir de 5 échantillons longitudinaux, entre 16 et 38 mois après la date présumée d'infection. Cette lignée d'anticorps utilisait le gène de chaîne lourde VH4-34*01 et JH5*01 et le gène de chaîne légère kappa VK3-20*01 et JK*01. De façon très intéressante, cette utilisation de gène était identique chez un autre donneur du Protocole C, PC39 *(manuscrit en préparation)*, bien que les anticorps communs non mutés (UCA) des lymphocytes B naïfs n'étaient pas strictement identiques et que l'évolution des lignées d'anticorps était différente.

La longueur de la boucle CDRH3 était de 22 acides aminés ce qui est plus que la moyenne des IgG humain qui se situe entre 14 et 16 acides aminés *(Shi, Theor Bio Med Model, 2014)* mais raisonnable par rapport à d'autres anticorps neutralisants à large spectre. Le taux de mutations de la chaîne lourde de ces anticorps par rapport à l'UCA était de 4% de nucléotides à 16 mpi et atteignait 16% de nucléotides pour un anticorps isolé à 38 mpi. Le taux de mutation de la chaîne légère variait de 5 à 11% de nucléotides. Cette lignée d'anticorps n'a pas subi d'insertion ou délétion au cours de sa maturation.

- **Séquençage longitudinal des chaînes lourdes d'immunoglobuline**

Le séquençage nouvelle génération des chaînes lourdes d'immunoglobuline du donneur a été réalisé de façon longitudinale entre 5 et 66 mpi à partir d'extraits d'ARN des échantillons de cellules mononucléées périphériques sanguines (Figure III-2). La fréquence des séquences apparentées à la lignée PCDN atteignait son maximum à 22 mpi, précédant de peu l'augmentation de la neutralisation à large spectre dans le sérum qui culminait à 33 mpi. Le profil de l'arbre phylogénétique de la lignée PCDN montrait une diversification très rapide de la lignée puis une évolution en branches parallèles qui pour la plupart ont stoppé leur évolution à 33 mpi. En effet, la fréquence de la lignée PCDN qui avoisinait 0,8 % du répertoire total de lymphocyte B chutait dès 27 mpi pour ne représenter plus que 0,2 % du répertoire.

L'anticorps mature de 33 mpi et les anticorps matures de 38 mpi n'appartenaient pas à la même branche, révélant une évolution divergente. De plus, des branches pour lesquels des anticorps n'ont pas pu être isolés ont poursuivi leur évolution jusqu'à des temps tardifs et pourraient avoir développé également une neutralisation à large spectre. Ainsi, des parcours d'évolution différents ont abouti à l'acquisition d'une neutralisation à large spectre. Le séquençage nouvelle génération a également révélé que la divergence génétique par

rapport à l'UCA atteignait un plateau vers 33 mpi bien que les anticorps continuaient à acquérir des mutations sur des positions déjà mutées. Le nombre de séquences reconnues par l'AID étant pourtant en constante diminution au cours de l'évolution par hypermutations somatiques, cela suggérait une pression de sélection importante aux positions mutant à répétition.

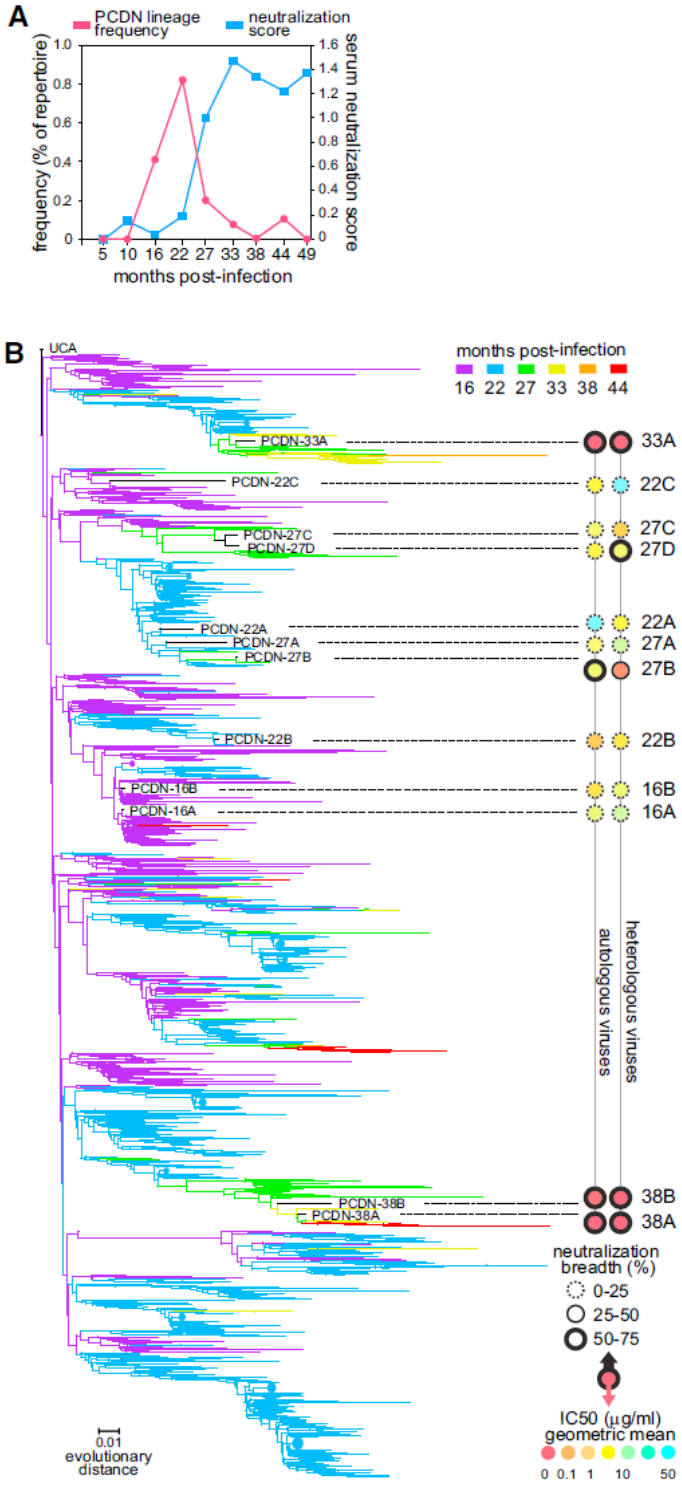


Figure III-2 : Données préliminaires sur l'évolution de la lignée PCDN. A) Fréquence des séquences de chaînes lourdes de la lignée PCDN identifiées par séquençage nouvelle génération (rose) et évolution du score de neutralisation (bleu) entre 5 et 49 mpi. B) Arbre phylogénétique des chaînes lourdes de la lignée PCDN à partir du séquençage nouvelle génération sur 6 temps après infection représentés par 6 couleurs. Les anticorps monoclonaux isolés sont indiqués à droite avec leurs neutralisations autologues et hétérologues. L'épaisseur des cercles représente la largeur de spectre et la couleur représente l'IC50 moyenne.

▪ Neutralisation hétérologue

La neutralisation hétérologue des anticorps testée sur le panel de 37 virus montrait une nette évolution de la largeur de spectre au cours du temps, avec jusqu'à 70 % de virus neutralisés par les anticorps de 38 mpi (Figure III-3). Cette progression a permis de définir les anticorps isolés entre 16 et 27 mpi (16A, 16B, 22A, 22B, 22C, 27A, 27C, 27D) comme précoces car neutralisant peu de virus hétérologues. Les anticorps les plus matures 33A, 38A et 38B avaient des largeurs de spectre supérieures à 65 % et neutralisaient avec une IC50 moyenne d'un ordre de grandeur 10 à 100 fois plus faible que les autres anticorps de la lignée. L'anticorps 27B était considéré comme intermédiaire de par sa neutralisation hétérologue à 32% et sa neutralisation autologue se rapprochant des anticorps matures comme discuté plus bas. Sur un panel plus large de 110 virus établi par Seaman *et al.*, les largeurs de spectre étaient plus faibles, comme attendu étant donné la surreprésentation dans le panel de 37 virus de virus de sous-type B, généralement plus sensibles aux anticorps ciblant la région N332 (Figure III-3). L'anticorps le plus efficace était 33A avec 47 % des 110 virus neutralisés avec une IC50 moyenne de 0,53 µg/mL.

A 37 virus

% de virus neutralisés (0 — 50 — 100)

subtype	# viruses	16A	16B	22A	22B	22C	27A	27B	27C	27D	33A	38A	38B
A(A/E)	5	0	0	0	20	0	0	0	0	0	40	40	40
B	22	9	18	9	32	5	5	41	18	50	77	77	82
C	10	0	0	30	10	0	0	30	10	80	60	50	60
total	37	5	11	14	22	3	3	32	14	51	68	65	70

IC50 moyen (IC50 (µg/ml) 0 — 1 — 10 — 50 — 100)

subtype	# viruses	16A	16B	22A	22B	22C	27A	27B	27C	27D	33A	38A	38B
A(A/E)	5				91.75						0.20	4.19	0.27
B	22	52.84	31.72	9.22	9.28	97.82	53.00	5.14	10.01	28.48	0.09	0.24	0.06
C	10			21.89	12.42			1.73	13.96	25.43	2.19	1.20	0.31
total	37	52.84	31.72	15.49	12.37	97.82	53.00	3.91	10.70	27.15	0.20	0.42	0.10

B 110 virus

% de virus neutralisés

clade	n	33A	38A	38B
A	11	64	36	64
AC	6	33	33	33
AE	13	0	8	8
AG	9	44	33	33
B	16	88	81	75
BC	8	38	38	63
C	31	42	29	42
CD	5	40	40	40
D	4	50	50	50
G	7	71	0	57
total	110	47	36	46
IC50 moyen		0.53	1.46	1.08

Figure III-3 : Données préliminaires sur la neutralisation hétérologue par les anticorps de la lignée PCDN. A) Neutralisation du panel de 37 virus. B) Neutralisation du panel de 110 virus.

Sur la base de la comparaison des séquences de protéines d'enveloppe de virus neutralisés et non neutralisés, le glycane en position N332 et la présence d'une tyrosine en position 330 à la place d'une histidine semblaient des caractéristiques cruciales pour la neutralisation.

La cartographie de l'épitope a été réalisée sur le virus JRCSF pour lequel on disposait de la librairie presque complète des mutations en alanine des résidus de la gp120. La neutralisation par les trois anticorps matures 33A, 38A et 38B était diminuée par les mutations de la boucle V1 en F159 et du glycane N156, par les mutations de la boucle V2 en Y177 et L179, par la mutation des glycanes N301 et N332 de la boucle V3 et des résidus K305, I307, I309, F317, Y318, I323, G324, R327, A329 et H330.

Pour confirmer ces résultats, des mutations ont été introduites sur 6 autres virus de différents sous-types. La mutation du glycane N301 était délétère dans tous les cas tandis que la mutation du glycane N295 n'avait pas beaucoup d'effet. La mutation délétère du glycane N156 a été confirmée sur un autre virus pour l'anticorps 38B. Les glycanes N386 et N392 avaient aussi un effet sur cet anticorps et sur l'anticorps 33A dans une moindre mesure.

Le traitement des virus à la kifunensine ainsi que la production des virus en cellules HEK293S déficientes pour l'expression de GntI diminuaient la neutralisation par les trois anticorps les plus matures. En revanche, le traitement à la swainsonine n'avait pas d'effet, ce qui indiquait la nécessité de glycanes hybrides et non complexes pour la fixation à la protéine d'enveloppe. Par ailleurs, une étude de fixation directe des anticorps sur des glycanes synthétiques disposés sur une puce montrait une fixation sur $Man_9GlcNac_2$ uniquement et aucune fixation n'était détectable sur les glycanes hybrides, ce qui pourrait s'expliquer par une affinité en dessous du seuil de sensibilité de la méthode.

- **Neutralisation autologue**

Le donneur PC76 était infecté par un VIH-1 de sous-type C. Les virus autologues de plusieurs temps après infection entre 5 et 44 mpi ont été clonés et séquencés à partir des échantillons de plasma du donneur, et testés pour la neutralisation par les anticorps de la lignée (Figure III-4). Les anticorps précoces ne neutralisaient que certains des virus issus de 10 mpi. L'absence de neutralisation des virus à 5 mpi suggérait que l'activation du lymphocyte B naïf et l'initiation de la lignée se sont produit entre 5 et 10 mpi. L'absence de neutralisation des virus de 16 mpi montrait un échappement viral très rapide de la neutralisation par ces anticorps précoces. Les anticorps matures et l'anticorps intermédiaire 27B neutralisaient la plupart des virus dès 5 mpi ce qui signifiait que l'acquisition d'une adaptation à la variabilité génétique de la protéine d'enveloppe a permis à ces anticorps de neutraliser des souches virales qui n'étaient pas reconnues par les anticorps précoces de la lignée. La neutralisation par les anticorps matures continuait jusqu'à 22 mpi où l'échappement viral était total pour tous les anticorps de la lignée. A partir de 27 mpi, si les anticorps ne reconnaissaient plus aucun des variants de protéines d'enveloppe autologues, la prolifération clonale des anticorps de la lignée aurait dû cesser avec la stimulation antigénique. Cependant, des séquences de chaînes lourdes ont été observées dans le séquençage nouvelle génération jusqu'à 44 mpi ce qui suggère la persistance d'une stimulation antigénique.

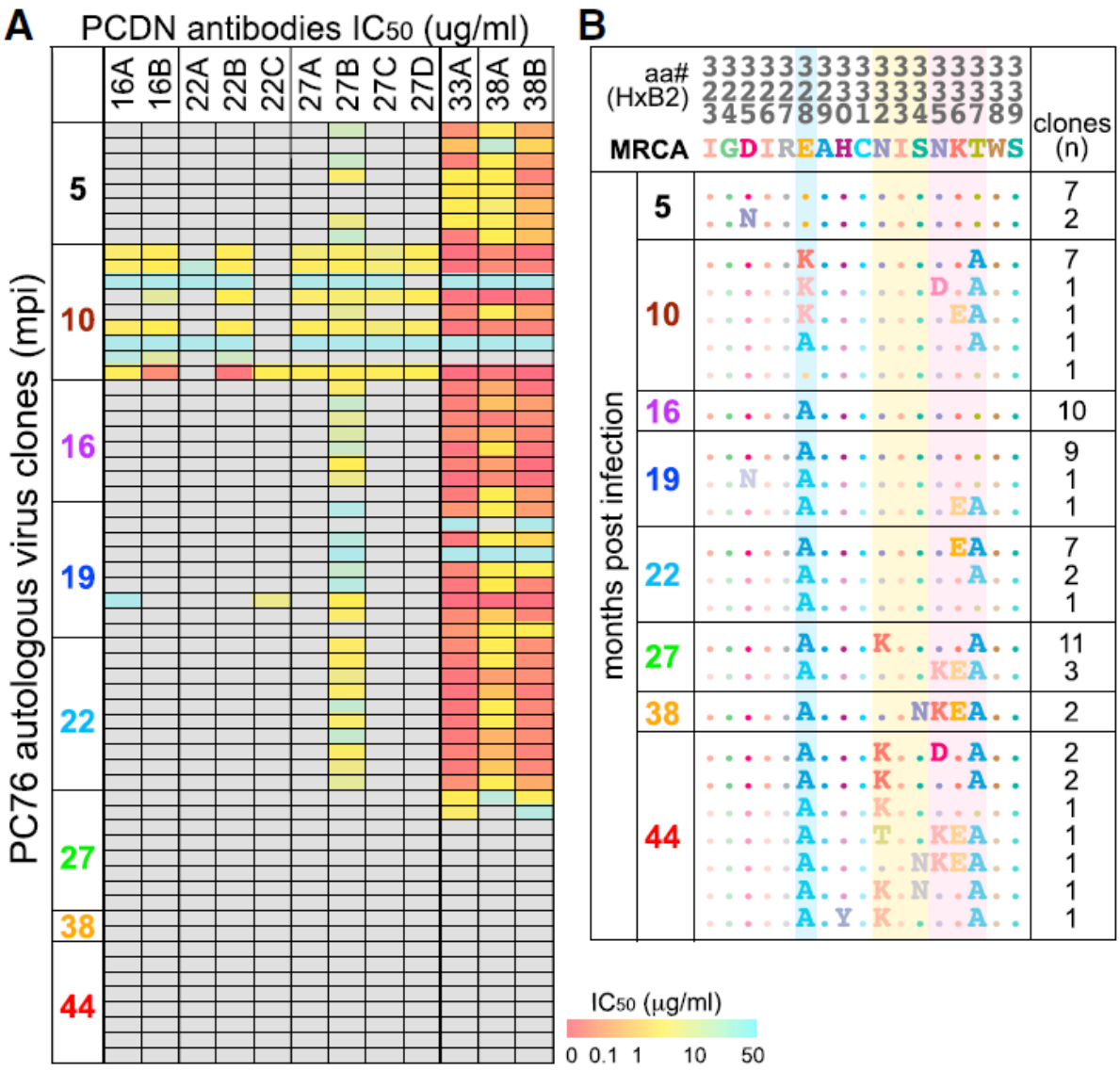


Figure III-4 : A) Données préliminaires sur la neutralisation autologue des virus de PC76 par les anticorps de la lignée PCDN. Les IC50 sont représentées des plus faibles au plus élevées en coloris rouge à bleu. B) Evolution de la séquence des virus autologues sur une partie de la boucle V3. Les positions 328 et les glycanes N332 et N335 expliquent la coévolution anticorps-virus.

- **Coévolution anticorps-virus**

L'analyse de l'évolution des virus autologues couplée à des résultats de neutralisation sur virus mutés a permis de décrypter la coévolution entre le virus et les anticorps. Les mutations E328K et T337A supprimant le glycane en position N335 sont apparus à 10 mpi. Le glycane en position N335, qui peut être glycosylé simultanément avec le glycane N332 et qui est présent dans moins d'un pourcent des séquences de la base de données Los Alamos, était une particularité du virus infectant ce donneur. L'introduction des deux mutations dans un virus de 5 mpi permettait la neutralisation par quelques anticorps précoces et de façon réciproque, la mutation K328E d'un virus de 10 mpi abolissait la neutralisation par tous les

anticorps précoces. Ces deux changements dans la protéine d'enveloppe autologue ont donc pu être à l'origine de l'activation du lymphocyte B naïf entre 5 et 10 mpi.

La position K328 a muté à nouveau en alanine à 16 mpi ce qui a entraîné l'échappement viral pour les anticorps précoces comme l'a confirmé l'introduction de la mutation dans le clone de 10 mpi qui abolissait la neutralisation par les anticorps précoces. Cependant, cette mutation n'affectait pas les anticorps intermédiaires et matures qui étaient effectivement capables de neutraliser les virus après 16 mpi. Par la suite à partir de 27 mpi, le glycane en position 332 était supprimé par les mutations N332K et S334N, expliquant l'échappement viral final pour les anticorps les plus matures. En effet, tous les anticorps de la lignée étaient sensibles à la suppression du glycane en position 332, aussi bien pour les virus autologues qu'hétérologues.

- **Structures cristallographiques des fragments Fab**

Les structures cristallographiques à haute résolution de 6 fragments Fab (UCA, 16A, 16B, 27A, 27B et 33A) ont été résolues par Fernando Garces et Rotimi Omorodion de l'équipe d'Ian Wilson au Scripps Research Institute (Figure III-5).

Sur la chaîne lourde, le FR1 forme deux brins bêtas antiparallèles exposés à la surface et distants de l'apex. Le FR2 prend part à la formation de deux brins bêtas cachés dans la structure. Le FR3 est entre le FR1 et le FR2 et possède deux brins bêtas exposés. La boucle CDRH1 est en partie repliée en brins bêtas, mais peu exposée. Au contraire, le CDRH2 finit un brin bêta et en place un autre de façon antiparallèle qui encercle une grande partie de la base de la boucle CDRH3. La boucle CDRH3, déterminant primaire de l'interaction avec l'antigène, prend un angle de 90 degrés avec les autres brins bêta et s'étend au-dessus des autres boucles à une quinzaine d'angströms. Elle constitue l'apex du fragment Fab. La surface de la chaîne lourde est donc principalement composée de 7 brins bêtas antiparallèles dont le plus proche de l'apex est formé par le CDRH2. A mi-distance de l'apex, le FR3 forme deux brins bêtas exposés et enfin le FR1 forme les deux brins bêta les plus distants.

L'organisation de la chaîne légère est assez similaire. Les régions FR sont organisées en feuillets bêta antiparallèles. Cinq brins sont exposés à la surface et quatre brins sont cachés dessous. Le FR1 est exposé et est le plus distant de l'apex du fragment Fab. Le FR2 est à l'interaction avec la chaîne lourde et non exposée à la surface. Le FR3 se positionne entre le FR1 et le FR2, en partie exposé. Les boucles CDR ne possèdent pas de structure secondaire et se positionnent sous la boucle CDRH3. La boucle la plus protubérante de la chaîne légère est la boucle CDRL1.

L'anticorps anti-V3 le plus similaire en termes de structure est PGT135. Cependant, les anticorps PCDN ne dépendent pas de l'interaction avec les mêmes glycanes.

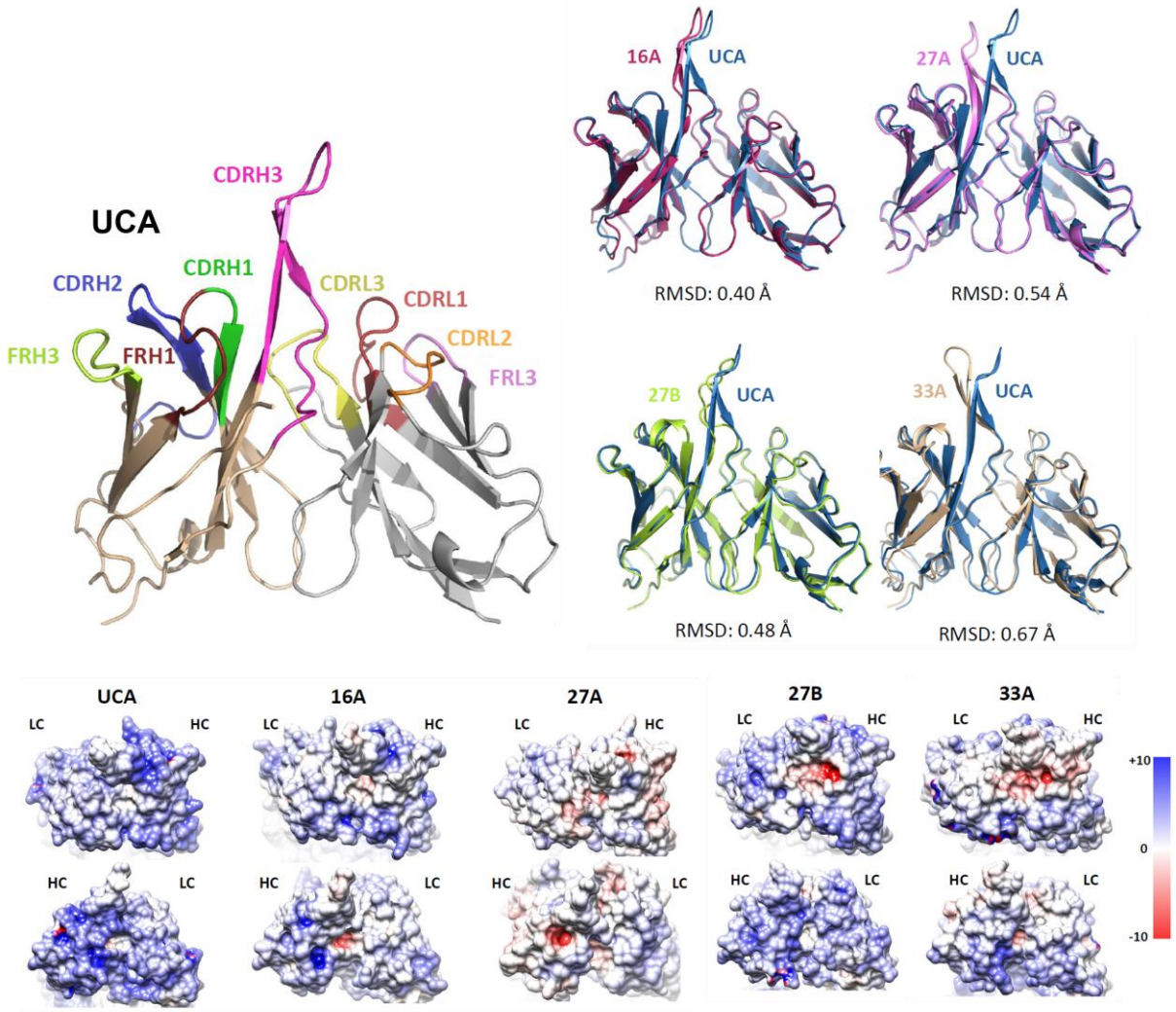


Figure III-5 : Structures cristallographiques des fragments Fab des anticorps de PC76 produites par Rotimi Omorodion. Les divergences structurales de 16A, 27A, 27B et 33A par rapport à l'UCA sont indiquées (rmsd en angström). Les potentiels électrostatiques de surface sont représentés pour deux orientations des fragments Fab, en rouge les charges négatives et en bleu les charges positives.

Les fragments Fab possèdent la plus grosse divergence structurale au niveau de la boucle CDRH3, notamment pour les anticorps 27A et 33A. Cette modification de l'angle de la boucle pourrait avoir un rôle important pour la liaison à la protéine d'enveloppe et expliquer les différences de largeurs de spectre. Selon toute vraisemblance, la boucle CDRH3 pénètre le bouclier de glycanes pour interagir avec des résidus protéiques, comme c'est le cas des autres anticorps ciblant la région N332 dont la structure a été résolue en complexe avec la gp120 monomérique ou le trimère. Les résidus aromatiques conservés sur la boucle CDRH3 peuvent être en contact avec le motif GDIR ou avec les sucres de la protéine d'enveloppe par des interactions d'empilements de façon similaire à l'interaction de PGT124 *(Garces, Cell, 2014).*

La représentation du potentiel électrostatique de la surface des fragments Fab de 27A, 27B et 33A montre des cavités profondes chargées négativement et positionnées à la base de la boucle CDRH3. Ces cavités pourraient accommoder des glycanes de la protéine d'enveloppe ou une partie d'une des boucles variables. De plus, ces cavités sont absentes des anticorps précoces UCA et 16A ce qui pourrait indiquer que ces caractéristiques jouent un rôle dans l'acquisition de la neutralisation à large spectre.

▪ Contexte des travaux de thèse sur le donneur PC76

Le travail décrit dans le manuscrit de MacLeod et Choi *(MacLeod, Immunity, 2016)* a permis d'élucider en partie l'ontogénie de la lignée d'anticorps. Notamment, certaines caractéristiques de la protéine d'enveloppe ayant permis l'activation du lymphocyte B naïf puis l'échappement viral ont été révélées. Cependant, l'interaction entre l'UCA et une protéine d'enveloppe virale autologue n'a pas été observée et apporterait un éclairage important sur l'activation du lymphocyte B naïf à l'origine de la lignée. De plus, la structure d'un anticorps en complexe avec la protéine d'enveloppe préciserait l'ensemble des déterminants moléculaires de cette interaction. Cela permettrait une meilleure comparaison avec le mode d'interaction d'autres anticorps ciblant la région N332. Ensemble, ces données pourraient permettre de mettre au point des immunogènes capables de mimer cette interaction et de diriger l'évolution des anticorps vers une neutralisation la plus large et affine possible.

Pour compléter cette étude, nous avons donc souhaité identifier le clone de protéine d'enveloppe autologue ayant induit la lignée. De plus, l'antigénicité des protéines d'enveloppes virales autologues à été caractérisée avec plusieurs anticorps neutralisants à large spectre afin d'aider le travail des équipes d'Ian Wilson et d'Andrew Ward pour l'obtention de la structure d'un complexe. L'activité des lignées d'anticorps issues des donneurs PC76 et PC39 a été comparée par test de neutralisation croisé. Enfin, afin de comprendre l'évolution de la lignée et l'acquisition de la neutralisation hétérologue à large spectre chez ce donneur, le paratope a été cartographié par mutagénèse dirigée des anticorps et test de neutralisation des anticorps mutants.

Partie 2) Résultats

A) Données complémentaires

▪ Neutralisation des virus autologues de PC76 par des anticorps neutralisants à large spectre

Afin de caractériser l'antigénicité globale des protéines d'enveloppes issues du donneur PC76, leurs neutralisations par des anticorps neutralisants à large spectre ciblant différentes régions du trimère ont été testées. Ainsi, les virus autologues de 5 mpi (V0), 10 mpi (V12) et 22 mpi (V21) ont été testés pour la neutralisation par des anticorps ciblant la région N332 (PGT121, PGT124, PGT128, PGT135 et 2G12), des anticorps ciblant l'apex (PGT145 et PG9), un anticorps anti-MPER (10E8), des anticorps ciblant l'interface gp120-gp41 (PGT151 et 35O22) et un anticorps anti-CD4bs (F105) (Figure III-6). Le but de ces données est d'aider l'étude structurale qui fait souvent appel à des anticorps pour la purification de trimères et la stabilisation en complexes avec des fragments Fab.

			Anticorps											
			PC76	N332					Apex		Interface		MPER	CD4bs
			33A	PGT121	PGT124	PGT128	PGT135	2G12	PGT145	PG9	PGT151	35O22	10E8	F105
Pseudovirus PC76	5 mpi	V0-10	0,08	0,06	0,04	0,01	NN	0,05	0,01	0,60	NN	1,04	1,53	NN
		V0-53	0,06	0,07	0,04	0,35	5,28	0,08	0,03	1,54	NN	8,22	2,12	NN
		V0-66	0,15	0,14	0,13	0,15	NN	0,16	0,02	1,01	NN	0,64	1,81	NN
		V0-72	0,31	0,13	0,05	0,35	NN	0,05	0,03	5,86	NN		5,03	NN
		V0-82	0,46	0,16	0,24	0,52	NN	0,09	0,43	11,75	NN	4,74	6,31	NN
		V0-87	0,25	0,09	0,06	0,15	NN	0,03	0,07	1,79	NN	6,47	2,85	NN
		V0-15	0,06	0,06	0,06	0,03	NN	0,19	0,09	1,68	NN	1,76	0,43	NN
	10 mpi	V12-08	0,05	0,09	0,12	0,04	0,05	1,01	31,72	NN	NN	5,51	6,46	NN
		V12-09	0,02	0,05	0,03	0,01	13,94	0,21	17,40	NN	NN	6,96	1,49	NN
		V12-30	0,01	0,09	0,10	0,03	0,06	0,63	0,12	6,57	NN	1,03	1,10	NN
		V12-33		0,10	0,15	0,05	0,11	1,00	0,07	12,39	NN	1,55	2,10	NN
		V12-43	1,00	0,10	0,05	0,08	7,97	0,49	4,95	NN	NN	4,61	2,74	NN
	22 mpi	V21-14		0,08	0,06	0,04	0,84	0,16	2,60	31,82	NN	2,05	2,40	
		V21-20	0,10	0,20	0,11	0,06	4,32	2,21	0,75	NN	NN	1,80	7,95	NN
		V21-36	0,24	0,21	0,19	0,06	0,32	1,56	0,07	8,12	NN		0,92	NN

Figure III-6 : Neutralisation des pseudovirus autologues de PC76 par des anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332, l'apex, l'interface, le MPER ou le CD4bs.

Les anticorps contre la région N332 PGT121, PGT124, PGT128 neutralisaient bien les virus autologues des 3 temps après infection avec une IC50 moyenne de 0,11 µg/mL. Cependant, PGT135 ne neutralisait pas les virus autologues de 5 mpi à l'exception du clone V0-53. Par contre, 2G12 avait de meilleures IC50 sur les virus de 5 mpi que de 10 mpi et 22 mpi. Ces résultats indiquent que l'utilisation comme immunogènes des protéines d'enveloppe de PC76 pourrait induire ou stimuler le développement d'anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 autres que la lignée PCDN.

L'activité de 35O22 contre les virus autologues était d'affinité plus faible que reportée précédemment sur un large panel avec une médiane d'IC50 de 2,05 µg/mL contre 0,033 µg/mL *(Huang, Nature, 2014).* F105 ne neutralisait aucun clone sans surprise étant donné le spectre très restreint de virus qu'il neutralise *(Pancera, Virology, 2005).* De façon plus surprenante, PGT151 n'était pas neutralisant contre les virus autologues. La comparaison d'une séquence neutralisée par PGT151 249M.B10 et d'une séquence non neutralisée CE0393.C3 *(Falkowska, Immunity, 2014)* toutes deux très proches des virus autologues n'a pas montré de caractéristiques évidentes expliquant cette résistance. Celle-ci doit donc être due à la conformation de la région de l'interface gp120-gp41. PGT151 ne peut donc probablement pas être utilisé pour la purification de trimères issus de ce donneur.

- **Réactivité croisée des anticorps de PC39 et de PC76 avec les protéines d'enveloppe de PC39 et PC76**

Les donneurs PC39 et PC76 sont tous deux infectés par un virus de sous-type C qui a conduit l'évolution de deux lignées partageant le même usage de gène. Cependant, les UCA à l'origine des lignées, l'évolution des lignées et la coévolution avec les virus autologues sont très différents. Les modes d'interaction des anticorps de PC76 et de PC39 avec la protéine d'enveloppe ne sont pas connus en détail. Afin de comparer les anticorps de PC76 avec les anticorps de PC39, ainsi que les caractéristiques de leurs protéines d'enveloppe autologues respectives, un test de neutralisation croisé a été réalisé (Figure III-7). Huit anticorps de PC76 ont été testés pour la neutralisation de 7 virus de PC39. Six anticorps de PC39 ont été testés pour la neutralisation de onze virus de PC76.

			Pseudovirus PC76												Pseudovirus PC39						
			5 mpi				10 mpi					22 mpi			0 mpi		6 mpi		18 mpi		
			V0-53	V0-72	V0-82	V0-87	V12-08	V12-09	V12-30	V12-33	V12-43	V21-14	V21-20	V21-36	V0-15	V0-110	V6-40	V6-42	V18-014	V18-145	V18-185
Anticorps PC76		UCA	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	27 mpi	27A	NN	NN	NN	NN	2,87	POS		1,68	NN	NN		NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
		27B	8,03	47,82	28,64	9,22	0,52	0,43	0,54	0,34	NN	NN	0,43	4,97	14,39	NN	6,64	52,20	3,58	2,02	4,23
		27C	NN	NN	NN	NN	8,51	POS		10,00	NN	NN		NN	NN	NN	84,82	NN	NN	45,18	NN
		27D	NN	NN	NN	NN	6,60	NEG		5,81	NN	NN		NN	5,46	86,44	5,72	21,95	10,31	10,60	17,69
	33 mpi	33A	0,03	0,18	0,30	0,27	0,01	POS		0,02	NN	POS		POS	0,05	3,47	0,03	0,06	0,06	0,04	0,11
	38 mpi	38A	2,79	3,74	8,96	2,71	0,07	0,09	0,04	0,05	NN	NN	0,06	0,15	0,11	NN	0,16	0,47	0,10	0,13	0,19
		38B	0,08	0,07	0,12	0,12	0,03	POS		0,03	NN	POS		POS	0,05	NN	0,03	0,07	0,04	0,04	0,05
Anticorps PC39		UCA	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN		NN	NN	NN							
	24 mpi	7G11	0,14	0,15	0,26	0,21	0,13	0,10	0,05	0,10		NN	0,09	0,05							
	42 mpi	31D8	NN	8,01	41,92	20,70	0,70	1,07	0,36	0,52	NN	NN	0,36	0,52							
	54 mpi	44E10	2,45	0,29	0,61	0,48	0,13	0,17	0,09	0,04		NN	0,10	0,04							
		46F3	1,80	0,36	0,46	0,34	0,14	0,08	0,15	0,12		NN	0,13	0,08							
	60 mpi	49G9	0,15	0,16	0,22	0,19	0,19	0,10	0,17	0,14		NN	0,20	0,12	0,08	0,05		0,04	0,36	10,24	NN

Figure III-7 : Neutralisation croisée des anticorps de PC76 et de PC39 (gauche) avec les pseudovirus portant les protéines d'enveloppes de PC76 et PC39 (haut). L'anticorps PC39-49G9 est le seul de ce panel à avoir été testés par Monogram Biosciences pour la neutralisation des pseudovirus autologues de PC39. Les données de neutralisation des anticorps de PC76 avec les virus autologues de PC76 sont reprises des données de Monogram Biosciences pour 27A, 27C, 27D, 33A et 38B. Les données de l'UCA, 27B et 38A sont reprises du test de neutralisation sur virus précoces décrit plus bas et concordent avec les données de Monogram. POS : neutralisation identifiée par Monogram Biosciences mais IC50 non calculée. Les cases vides correspondent à des données non produites.

L'affinité de neutralisation des anticorps de PC76 pour les virus autologues et pour les virus de PC39 était globalement du même ordre de grandeur. De plus, l'évolution de la force de neutralisation des anticorps de PC76 entre les anticorps précoces, intermédiaires et matures était retrouvée pour la neutralisation des virus de PC39. En effet, l'UCA, 27A, 27C et 27D avaient des IC50 élevées ou pas de neutralisation sur les deux panels tandis que les anticorps matures 33A, 38A et 38B, ainsi que dans une moindre mesure 27B, avaient des IC50 faibles, comparables sur les deux panels. En revanche, les anticorps de PC39 avaient une activité légèrement plus faible sur les protéines d'enveloppe de PC76 que sur les protéines d'enveloppe autologues de 0 et 6 mpi (données Monogram non montrées). L'activité était plutôt comparable à la neutralisation des virus autologues de PC39 du mois V12 avec une IC50 médiane de l'ordre de 0,15 µg/mL.

Ces données soulignent l'acquisition d'une neutralisation hétérologue par les anticorps intermédiaires et matures du donneur PC76 qui sont capables de neutraliser les virus issus du donneur PC39. De même, les anticorps du donneur PC39 à l'exception de l'UCA ont une activité hétérologue sur les virus issus du donneur PC76. Tout en suggérant une certaine ressemblance dans le mode d'interaction de ces deux lignées d'anticorps, ces résultats n'ont pas apporté d'éléments nouveaux à la compréhension du détail moléculaire de cette interaction. Cependant, on peut conclure qu'il est possible que des immunogènes basés sur ces séquences autologues seraient capables de stimuler l'activation et l'évolution des deux lignées.

- **Liaison ou neutralisation des virus précoces par l'UCA**

Nous avons cherché à identifier le clone viral ayant activé le lymphocyte B naïf et initié la lignée PCDN. Pour cela, nous avons sélectionné et cloné 13 clones de protéines d'enveloppe autologues qui n'avaient pas été testées par MacLeod et al. Ces protéines d'enveloppe autologues étaient issues de deux temps précoces (5, 10 mpi) et de 22 mpi et ont été choisi pour la diversité de leurs séquences. L'UCA de la lignée PCDN a été inféré à partir de l'arbre phylogénétique du séquençage nouvelle génération des chaînes lourdes et la chaîne légère du gène correspondant dans la base de données IMGT.

L'UCA a d'abord été testé pour la neutralisation des quinze pseudovirus autologues de 5, 10 et 22 mpi (Figure III-8). L'UCA ne neutralisait aucune souche tandis que 27B et 38A neutralisaient avec des IC50 comparables aux données publiées.

	Neutralisation des pseudovirus, IC50 (µg/mL)															
	V0-10	V0-53	V0-66	V0-72	V0-82	V0-87	V0-15	V12-08	V12-09	V12-30	V12-33	V12-43	V21-14	V21-20	V21-36	HXB2
UCA	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
27B	65,39	8,03	7,79	47,82	28,64	9,22	41,12	0,52	0,43	0,54	0,34	NN	NN	0,43	4,97	NN
38A	10,57	2,79	3,35	3,74	8,96	2,71	5,78	0,07	0,09	0,04	0,05	NN	NN	0,06	0,15	NN

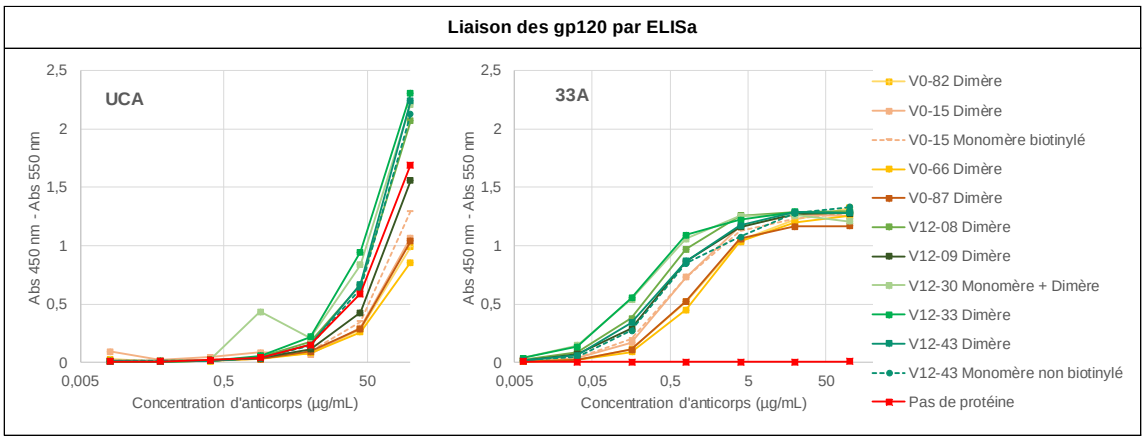


Figure III-8 : Neutralisation des pseudovirus autologues précoces de 5, 10 et 22 mpi par l'anticorps commun non muté de la lignée (UCA), 27B et 38A (haut). Liaison mesurée par ELISA des gp120 recombinantes issues des virus de 5 (dégradé de jaune) et 10 mpi (dégradé de vert) par les anticorps UCA et 33A. Le signal pour l'UCA au-delà de 50 µg/mL correspond au bruit de fond et n'est pas significatif d'une liaison aux gp120.

Les gp120 correspondantes ont ensuite été clonées et exprimées en cellules HEK293F et les monomères ou les dimères de gp120 recombinante ont été purifiés par chromatographie d'exclusion de taille. L'UCA a ensuite été testé par ELISA pour la liaison aux gp120 recombinantes autologues des temps précoces, monomériques ou dimériques. Le fort signal aux fortes concentrations d'anticorps UCA était comparable au contrôle sans gp120 attachée aux puits de plaque ELISA et était causé par une longue incubation du réactif de la péroxydase HRP. On peut conclure qu'aucune liaison n'a été observée avec l'UCA dans ce

test, tandis que 33A se liait à toutes les gp120 avec une concentration à 50% de fixation de l'ordre de 0,60 µg/mL, sans différence notable entre les monomères et les dimères.

Qu'elle soit détectée par ELISA ou neutralisation, il est rare d'observer une fixation de l'UCA à une protéine d'enveloppe virale. Cependant, on ne peut pas exclure qu'une très faible affinité de liaison indétectable par un ELISA ait pu suffire à activer le lymphocyte B à l'origine de la lignée. Il est possible également qu'aucun clone choisi ne comporte les caractéristiques de la protéine d'enveloppe ayant induit la lignée, bien qu'ils aient été choisis pour leur diversité génétique. De plus, les glycosylations des gp120 recombinantes exprimées en cellules HEK293F pourraient être suffisamment différentes des protéines d'enveloppe autologues *in vivo* et compromettre la liaison. Enfin, l'UCA peut requérir le trimère pour sa liaison, mais cela est peu probable puisque les anticorps qui en sont dérivés se fixent avec affinité à la gp120 monomérique.

Afin d'approfondir ces données, un test de fixation de l'UCA aux gp120 recombinantes doit être réalisé par résonnance plasmonique de surface, une technique plus sensible pour les affinités très faibles. Par ailleurs, le rôle des sucres pour la fixation de l'UCA n'ayant jamais été investigué, nous pourrions tester la neutralisation de pseudovirus autologues traités à la swainsonine.

- **Neutralisation du large panel de Seaman par les anticorps 27A et 27B**

Dans le cadre de la cartographie du paratope des anticorps de la lignée PCDN, nous avons cherché à définir les hypermutations somatiques ayant permis l'acquisition de la neutralisation à large spectre. L'anticorps précoce 27A et l'anticorps intermédiaire 27B sont des anticorps de choix pour une étude comparative de l'activité neutralisante, puisque leurs séquences ne possèdent que 24 différences en acides aminés. Néanmoins, ces différences permettent la neutralisation de 11 virus supplémentaires du panel de 37 virus par 27B. Cependant, 27A neutralise très peu de virus de ce panel ce qui complique l'analyse de l'effet de mutations du paratope. En effet, l'impact délétère d'une mutation de l'anticorps ne pourra pas être observée que si le pseudovirus est bien neutralisé. Afin de préciser leur différence de largeur de spectre et d'identifier des virus qui pourront être utilisés pour la comparaison des deux anticorps, le panel de Seaman de plus de 100 virus a été testé pour la neutralisation par 27A et 27B (Figure III-9).

Nos résultats ont montré que 27A et 27B neutralisaient moins de 10% du panel de Seaman et avaient peu de différences de largeur de spectre, bien que les virus neutralisés par 27A et 27B n'étaient pas les mêmes. En effet, aucun des 9 virus neutralisé par 27B n'était neutralisé par 27A et vice-versa pour les 8 virus neutralisés par 27A. En revanche, la plupart des virus neutralisés par 27B étaient neutralisés par les anticorps plus matures. Par ailleurs, dans une seconde expérience, 27A ne neutralisait pas les virus NIH64, NIH81, NIH94, NIH100

suggérant un manque de fiabilité de l'expérience sur de nombreux virus. Finalement, cette analyse n'a pas permis d'identifier de virus d'intérêt pour l'étude du paratope de 27A et 27B.

Code ADN	Sous-type	Nom du virus	27A	27B	33A	38A	38B
NIH-057	A	MS208.A1	NN	NN	1,84	NN	40,18
NIH-063	A	0330.v4.c3	NN	NN	3,97	22,52	45,30
NIH-064	A	0260.v5.c1	8,34	NN	1,77	7,00	8,03
NIH-065	A(T/F)	191955 A11	NN	39,31	NN	NN	NN
NIH-066	A(T/F)	191084 B7.19	NN	NN	2,69	4,16	0,79
NIH-067	A(T/F)	9004SS A3 4	NN	NN	8,46	14,44	3,02
NIH-058	A	Q23ENV17	NN	NN	0,10	2,31	0,23
NIH-059	A	Q461ENVe2	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-060	A	Q769ENVd22	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-061	A	Q259ENVd2.17	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-062	A	Q842ENVd12	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-099	AC	3301.v1.c24	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-100	AC	6041.v3.c23	7,98	NN	NN	NN	NN
NIH-101	AC	6540.v4.c1	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-102	AC	6545.v4.c1	NN	30,56	NN	NN	NN
NIH-103	ACD	0815.v3.c3	NN	NN	0,04	0,75	0,74
NIH-104	ACD	3103.v3.c10	NN	NN	0,04	4,56	0,10
NIH-068	CRF01_AE	620345.c01	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-069	CRF01_AE	C1080.c03	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-070	CRF01_AE	R2184.c04	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-071	CRF01_AE	R1166.c01	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-072	CRF01_AE	R3265.c06	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-073	CRF01_AE	C3347.c11	NN	NN	NT	NT	NT
NIH-074	CRF01_AE	C4118.c09	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-075	CRF01_AE	CNE8	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-076	CRF01_AE	CNE5	14,59	NN	NN	NN	NN
NIH-077	CRF01_AE	BJOX009000.02.4	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-078	CRF01_AE	BJOX015000.11.5	32,99	NN	NN	NN	NN
NIH-079	CRF01_AE	BJOX010000.06.2	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-080	CRF01_AE	BJOX025000.01.1	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-081	CRF01_AE	BJOX028000.10.3	6,47	NN	NN	29,86	46,19
NIH-106	CRF02_AG	T250.4	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-107	CRF02_AG	T251.18	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-108	CRF02_AG	T235.47	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-114	CRF02_AG	T257.31	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-115	CRF02_AG	928,28	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-116	CRF02_AG	T263.8	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-118	CRF02_AG	T255.34	NN	NN	0,03	0,04	0,02
NIH-119	CRF02_AG	T211,9	NN	NN	NT	NT	NT
NIH-001	B	6535,3	NN	NN	0,14	0,17	0,05
NIH-003	B	SC422661.8	NN	10,04	0,03	0,02	0,03
NIH-004	B	PVO.4	NN	NN	0,03	1,09	0,11
NIH-005	B	TRO.11	NN	NN	0,01	0,04	0,05
NIH-006	B	AC10.0.29	NN	NN	0,28	23,36	1,90
NIH-007	B	CAAN5342.A2	NN	NN	0,13	5,20	2,38
NIH-016	B	SC05.8C11.2344	NN	6,14	50,21	2,53	NN
NIH-008	B (T/F)	WEAU.d15.410.787	NN	NN	0,05	0,21	0,20
NIH-009	B (T/F)	1006.11.C3.1601	NN	NN	0,32	1,75	0,16
NIH-010	B (T/F)	1054.07.TC4.1499	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-011	B (T/F)	1056.10.TA11.1826	NN	NN	0,11	36,00	1,27
NIH-012	B (T/F)	1012.11.TC21.3257	NN	NN	0,02	1,38	0,63
NIH-013	B (T/F)	6240.08.TA5.4622	NN	NN	3,21	0,32	0,57
NIH-014	B (T/F)	6244.13.B5.4567	NN	NN	0,30	0,15	0,99
NIH-015	B (T/F)	62357.14.D3.4589	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-048	BC	CNE19	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-049	BC	CNE20	NN	NN	1,54	27,05	0,49
NIH-050	BC	CNE21	NN	NN	4,18	16,88	1,03
NIH-051	BC	CNE17	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-052	BC	CNE30	NN	NN	NN	NN	43,29
NIH-053	BC	CNE52	NN	NN	NN	NN	15,20
NIH-054	BC	CNE53	NN	NN	0,21	1,59	0,30
NIH-055	BC	CNE58	NN	NN	NN	NN	NN

Code ADN	Sous-type	Nom du virus	27A	27B	33A	38A	38B
NIH-017	C	Du156.12	NN	0,96	0,11	0,06	0,06
NIH-018	C	Du172.17	NN	NN	0,21	0,24	0,26
NIH-019	C	Du422.1	NN	0,32	0,26	0,06	0,12
NIH-020	C	ZM197M.PB7	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-021	C	ZM214M.PL15	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-022	C	ZM233M.PB6	NN	NN	3,12	45,36	NN
NIH-023	C	ZM249M.PL1	NN	NN	6,25	NN	21,23
NIH-024	C	ZM53M.PB12	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-025	C	ZM109F.PB4	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-026	C	ZM135M.PL10a	NN	NN	NT	NT	NT
NIH-029	C	HIV-001428.2.42	NN	NN	8,84	26,28	2,75
NIH-030	C	HIV-0013095.2.11	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-031	C	HIV-16055.2.3	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-032	C	HIV-16845.2.22	NN	NN	NT	NT	NT
NIH-041	C	BF1266.431a	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-042	C	ZM246F.D5	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-043	C	ZM249M.B10	NN	NN	2,76	12,92	2,73
NIH-044	C	ZM247F.F7	NN	NN	NN	NN	5,48
NIH-045	C	7030102001E5(Rev.)	NN	NN	0,00	1,24	0,29
NIH-046	C	1394C9G1(Rev.)	NN	NN	1,54	NN	1,77
NIH-033	C (T/F)	Ce1086 B2	NN	NN	NT	NT	NT
NIH-034	C (T/F)	Ce0393 C3	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-035	C (T/F)	Ce1176 A3	NN	NN	0,51	13,46	0,57
NIH-036	C (T/F)	Ce2010 F5	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-037	C (T/F)	Ce0682 E4	NN	NN	NT	NT	NT
NIH-038	C (T/F)	Ce1172 H1	NN	NN	0,79	19,33	1,02
NIH-039	C (T/F)	Ce2060 G9	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-040	C (T/F)	Ce703010054 2A2	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-047	C (T/F)	Ce704809221 1B3	NN	NN	36,78	NN	4,20
NIH-094	CD	3817.v2.c59	7,15	NN	NN	NN	NN
NIH-095	CD	6480.v4.c25	NN	3,32	0,01	0,04	0,02
NIH-096	CD	6952.v1.c20	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-097	CD	6811.v7.c18	NN	NN	0,04	0,20	0,02
NIH-090	D	A07412M1.vrc12	NN	3,42	0,04	0,43	0,14
NIH-091	D	231965.c01	34,22	NN	1,93	15,79	3,57
NIH-093	D(T/F)	191821 E6 1	NN	48,44	NT	NT	NT
NIH-082	G	X1193 c1	NN	NN	12,85	NN	30,74
NIH-083	G	P0402 c2 11	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-084	G	X1254 c3	NN	NN	39,69	NN	6,06
NIH-085	G	X2088 c9	26,70	NN	NN	NN	1,94
NIH-086	G	X2131 C1 B5	NN	NN	7,38	NN	NN
NIH-087	G	P1981 C5 3	NN	NN	0,90	NN	4,75
NIH-088	G	X1632 S2 B10	NN	NN	NN	NN	NN

		27A	27B	33A	38A	38B
IC50 moyen		17,31	15,84	4,53	8,92	6,40
Pourcentage de neutralisation						
Total		**8%**	**9%**	**46%**	**39%**	**48%**
Sous-type	**A**	9%	9%	55%	45%	55%
	AC	25%	25%	0%	0%	0%
	ACD	0%	0%	100%	100%	100%
	AE	21%	0%	0%	8%	8%
	AG	0%	0%	14%	14%	14%
	B	0%	13%	87%	87%	80%
	BC	0%	0%	38%	38%	63%
	C	0%	7%	48%	36%	48%
	CD	25%	25%	50%	50%	50%
	D	33%	67%	100%	100%	100%
	G	14%	0%	57%	0%	57%

Figure III-9 : Neutralisation du panel de Seaman de 105 virus par 27A et 27B. Les données de neutralisation de 33A, 38A et 38B sont issues de MacLeod, Immunity, 2016. Les pourcentages de neutralisation par sous-types sont indiqués dans le tableau en bas à droite. NT : virus pour lequel le titre viral était trop faible pour détecter une neutralisation.

B) Etude du paratope des anticorps PCDN de PC76

En l'absence d'une structure à haute résolution du complexe entre un anticorps de PC76 et une protéine d'enveloppe hétérologue ou autologue, le mode d'interaction n'est pas connu en détail. La cartographie de l'épitope a été réalisée sur des virus hétérologues et autologues et a défini les acides aminés et les glycanes de la protéine d'enveloppe critiques pour l'interaction *(MacLeod, Immunity, 2016)*. La cartographie du paratope des anticorps a pour but de comprendre quelles sont les déterminants moléculaires de l'interaction du côté des anticorps. Elle peut également permettre de comprendre quels événements dans l'évolution de la lignée d'anticorps ont permis l'acquisition d'une neutralisation de haute affinité, ainsi que l'acquisition de la neutralisation hétérologue à large spectre.

▪ Choix du panel de protéines d'enveloppe pour la cartographie du paratope

Le panel de protéines d'enveloppe choisi pour cette étude comprenait douze virus dont trois virus autologues de 5, 10 et 22 mpi. Les virus hétérologues appartenaient à trois sous-types (A, B et C) et ont été choisi pour leur diversité génétique au niveau de la boucle V3 (Figure III-10). L'anticorps le plus mature de la lignée, 33A, était capable de neutraliser tous ces virus, démontrant ainsi sa grande tolérance pour la variabilité de la région reconnue. En effet, 33A était capable de neutraliser le virus 93IN905 qui n'a pas de glycane en position N332 mais un glycane en position N334. Ce virus a également une phénylalanine au lieu d'une histidine en position 330. De même HXB2 était neutralisé par 33A et par aucun autre anticorps de la lignée. Ce virus ne possède pas le motif GDIR, mais la séquence GNMR en lieu et place.

				Neutralisation par les anticorps de PC76 IC50 (µg/mL)					Séquence de la gp120
Origine	Tiers	Sous-type	Virus	27A	27B	33A	38A	38B	Boucle V2 / Boucle V3
Hétérologue	2	A	KNH1144	NN	NN	0,67	NN	1,81	S F Y N C T R P N N N T R E S V R I - - G P G Q A F F A T G D I I G D I R Q A H C N V S R S Q
	2	A	92RW	NN	NN	0,02	1,45	0,10	S Y Y N C V R P N N N T R T S V R I - - G P G Q T F Y A T G E I I G D I R Q A F C T V N E S E
	2	B	SC422	NN	0,16	0,10	0,08	0,04	S F Y N C T R P N N N T R K G I T I - - G P G R V F Y - T G E I V G D I R Q V H C N L S S A K
	3	B	ADA	NN	83,42	0,10	0,41	0,08	S F Y N C T R P N N N T R K S I H I - - G P G R A F Y T T G E I I G D I R Q A H C N I S R T K
	1A	B	SF162	NN	1,38	0,01	0,03	0,01	S F H N C T R P N N N T R K S I T - - - G P G N A F Y A T G D I I G D I R Q A H C N I S - E K
	1B	B	HXB2	NN	NN	0,42	NN	NN	S F Y N C T R P N N N T R L R I R I Q R G P G R A F V T I G K - I G N M R Q A H C N I S R A K
	1B	C	93IN	NN	NN	0,24	NN	2,88	Q F F Y E C V R P N N N T R E S I R I - - G P G Q T F Y A T G E I I G D I R Q A H C N I S A D R
	2	C	DU156	NN	0,72	0,08	0,05	0,02	S F Y N C T R P N N N T R T S V R I - - G P G Q T F Y A T G D I I G D I R Q A H C N I S R N Q
	2	C	DU422	NN	0,09	0,40	0,14	0,02	S F Y N C T R P N N N T R K S V R I - - G P G Q T F Y A T G E I I G D I R E A H C N I S R E T
PC76		C	V0-15	NN	29,74	0,07	3,90	0,72	S F Y N C S R P N N N T R K S V R I - - G P G Q T F Y A M G D I I G N I R E A H C N I S N K T
		C	V12-33	4,74	0,31	0,04	0,07	0,02	S F Y N C S R P N N N T R K S V R I - - G P G Q T F Y A M G D I I G D I R K A H C N I S N K A
		C	V21-20	NN	1,03	0,10	0,16	0,03	S F Y N C S R P N N N T R K S V R I - - G P G Q T F Y A M G D I I G D I R A A H C N I S N E A

Figure III-10 : Panel de protéines d'enveloppe sélectionnées pour la cartographie du paratope avec indications des sous-types et tiers de sensibilité à la neutralisation, de la neutralisation par les 5 meilleurs anticorps de la lignée PC76, et des séquences de la boucle V3 ainsi que de quelques résidus de la boucle V2 montrés comme important par mutations sur JRCSF.

- **Choix des mutants en lien avec l'évolution de la lignée et les structures cristallographiques**

Pour étudier l'évolution de la lignée d'anticorps, nous avons produit une soixantaine de mutants d'anticorps par mutagénèse dirigée. Ces mutants allaient soit dans le sens de l'évolution, c'est-à-dire que l'on a introduit des mutations dans un anticorps afin qu'il porte le résidu présent chez un anticorps plus mature, soit dans le sens inverse de l'évolution, c'est-à-dire qu'on a introduit des mutations dans un anticorps afin qu'il porte le résidu présent chez un anticorps moins mature. La neutralisation devait dans le premier cas augmenter et dans le second cas diminuer. Il est plus difficile d'observer une augmentation de la neutralisation, car une mutation seule ne suffit pas toujours à reconstituer le contexte global de l'anticorps qui permet une neutralisation affine. A l'inverse, il est facile d'observer une diminution de la neutralisation, car une simple mutation peut modifier profondément la structure de l'anticorps ou rompre un contact clé de l'interaction.

Les mutations ont été introduites dans les régions variant beaucoup dans l'évolution de la lignée. Les résidus ciblés étaient en surface de l'anticorps et à l'apex, dans la zone probable d'interaction avec l'antigène. Les structures cristallographiques ont permis de vérifier que leurs positions les rendaient à même d'être en interaction avec l'antigène. Par ailleurs, nous avons évité de muter les résidus proline, qui engendrent un coude dans la structure secondaire des protéines et dont la mutation risquait d'être très déstructurante pour l'anticorps. De même pour les résidus à l'interface entre la chaîne lourde et la chaîne légère, dont la mutation peut induire de fortes contraintes sur la structure de l'anticorps et abolir la neutralisation, alors qu'ils ne font pas partie du paratope. Enfin, on a eu recours à des mutations en alanine, qui réduisent la chaîne latérale de l'acide aminé à son strict minimum pour observer un effet plus marqué.

La neutralisation hétérologue à large spectre est apparue sur au moins trois branches de l'arbre phylogénétique de la lignée correspondant aux anticorps isolés 27A-27B, 33A et 38A-38B. 27B et 27A sont des variants proches de la lignée, partageant plus de 88% d'identité sur la séquence variable de la chaîne lourde. Il y a 16 résidus différents sur la chaîne lourde et 8 résidus différents sur la chaîne légère. 27A est considéré comme un anticorps précoce, neutralisant un seul virus du panel de 37 virus et ne neutralisant que les virus autologues de 10 mpi. 27B est considéré comme un anticorps intermédiaire, notamment parce qu'il a le même profil de neutralisation des virus autologues que les anticorps matures. Sa largeur de spectre et son IC50 moyenne sont remarquablement plus élevées que 27A sur le panel de 37 virus. Cependant, ces données sont fortement nuancées par la neutralisation sur le panel de Seaman. Sur 105 virus, 27A et 27B ont des largeurs de spectre très similaires et ne neutralisent pas les mêmes virus (Figure III-9).

Les anticorps 38A et 38B sont également des homologues très proches avec seulement 8 différences dans la chaîne lourde et 3 différences dans la chaîne légère. Leurs

largeurs de spectre sont très proches même si 38B neutralise quelques virus supplémentaires et a une IC50 médiane meilleure.

L'anticorps 33A est le meilleur anticorps en termes de largeur de spectre et d'IC50. Il est capable de tolérer une plus grande variabilité génétique de la boucle V3, et même l'absence de glycane en N332 et de motif GDIR. Malheureusement, il est le seul anticorps isolé sur sa branche et partage plus de similitude avec l'UCA qu'avec tout autre anticorps isolé.

Ainsi, 27A et 27B ne sont pas les ancêtres de 33A qui n'est lui-même pas l'ancêtre de 38A et 38B. Ces anticorps, appartenant à des branches différentes, ont divergé très tôt dans l'évolution de la lignée, avant 16 mpi, le premier temps séquencé en nouvelle génération. Ce manque d'intermédiaires de développement de la lignée complique l'étude de l'acquisition de la neutralisation hétérologue par comparaison des anticorps entre eux.

L'analyse de l'évolution de la lignée PCDN fait apparaître plusieurs régions de haute variabilité (Figure III-11). Ainsi, la région à la fin de la FRH1 et le CDRH1, le début du CDRH2, deux régions de la FRH3 et enfin le CDRH3 mutent abondamment au cours de l'évolution. Un tel taux d'hypermutations somatiques sur des zones aussi restreintes peut être le fruit d'une pression de sélection importante à ces positions et indiquer que ces résidus participent au paratope. La chaîne légère est elle aussi soumise à de nombreuses hypermutations somatiques centrées sur le CDRL1, le CDRL2 et quelques positions du FRL3.

Une caractéristique de cette lignée d'anticorps est le grand nombre de sites de glycosylation qui apparaissent ou disparaissent au fil de l'évolution de la lignée. La majorité des anticorps (10/13) possèdent au moins un site de glycosylation. En tout, cinq sites sont sur la chaîne lourde (N26, N33, N52, N68 et N84) et quatre sur la chaîne légère (N26, N71, N73 et N75). Aucun site de glycosylation ne semble être conservé sur plusieurs branches de l'arbre phylogénétique de la lignée issu du séquençage des chaînes lourdes, hormis le site de glycosylation en N26 de la chaîne lourde qui est présent sur au moins deux branches éloignées de l'arbre (22C, 27B et 38B). Quatre anticorps précoces possèdent le site de glycosylation en N52 de la chaîne lourde. Les glycosylations de la chaîne légère ne concernent que les anticorps matures et deux anticorps précoces de 27 mpi.

Les mutants d'anticorps ont été testés pour la neutralisation du panel de virus sélectionnés et comparés aux anticorps WT (Figure III-12). Les expériences ont été réalisées en duplicats et les rapports d'IC50 ont été considérés comme significatifs s'ils dépassaient un facteur 2.

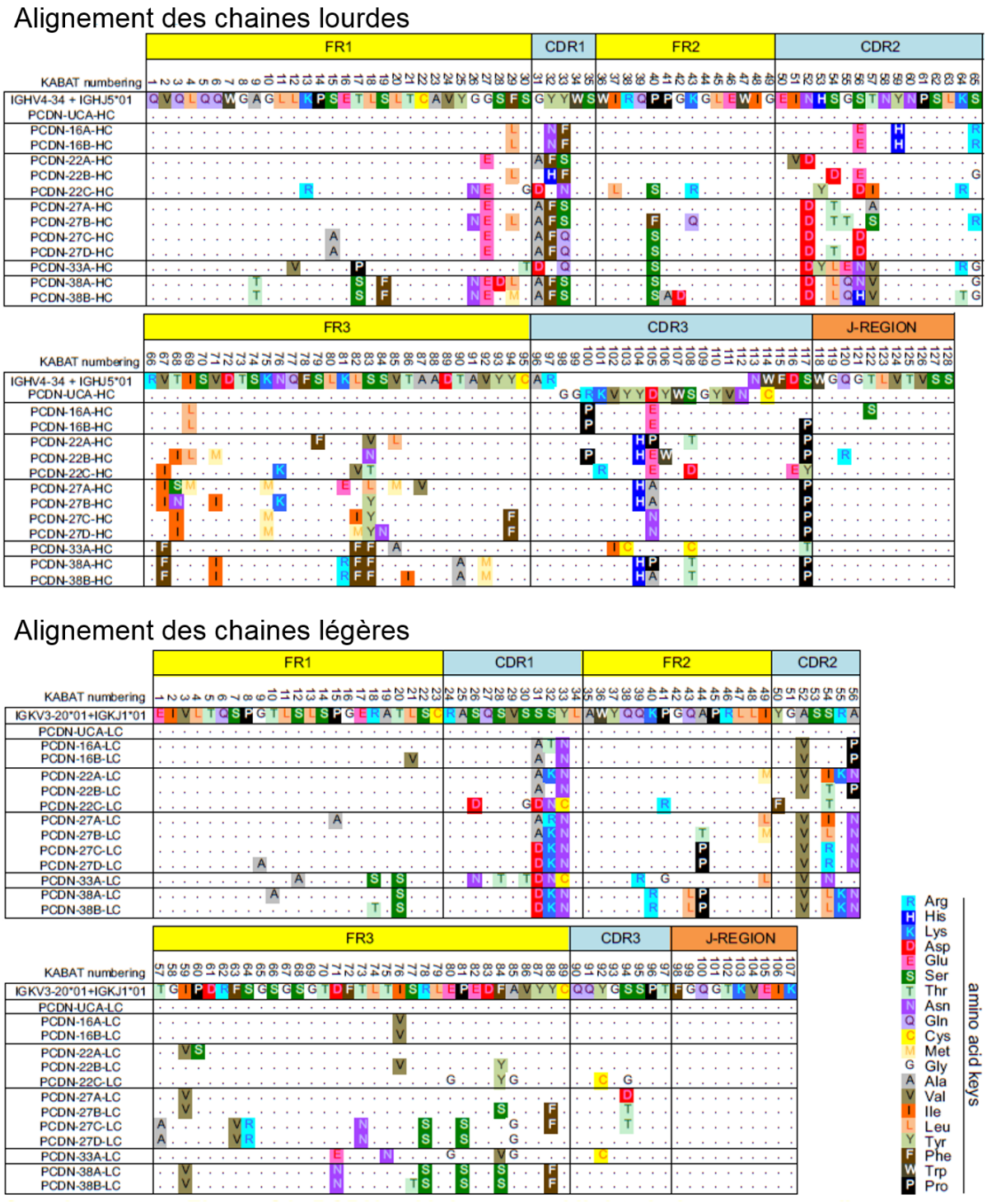


Figure III-11 : Evolution des chaînes lourdes et légères de la lignée PCDN.

	Rapport d'IC50 anticorps mutant / anticorps WT											
	KNH1144	92RW020	SC422	ADA	SF162	HXB2	93IN905	DU156	DU422	V0-15	V12-33	V21-20
27B HC N26A	<0,942	NN	0,77	>1,2	3,8	NN	NN	1,47	1,39	2,4	1,06	1,02
	<0,617	NN	0,70	NN	2,3	NN	NN	1,51	1,55	>1,29	1,58	1,45
38B HC N26A	NN	1,69	0,98	0,96	0,69	NN	1,98	0,99	0,83			
	0,06	2,5	0,69	0,56	1,14	NN	0,54	0,48	0,49	0,14	0,60	0,46
	0,12	1,16	0,87	6,6	1,16	NN	1,35	0,86	0,94	0,72	0,97	0,69
27B HC L29F	NN	NN	1,80	NN	0,44	NN	NN	2,1	1,63	0,98	4,8	1,33
	<0,643	>19,1	NN	2,8	5,0	10,4	>7,2	5,2	8,0	6,5	5,2	2,2
33A HC Y32F	1,31	1,08	0,99	0,84	1,25	2,5	1,57	0,97	0,57	0,91	1,19	0,68
	5,4		1,90	4,9	1,83		25	2,1	2,1	5,6	1,31	
	2,0	0,97	0,50	3,0			24	0,81	1,01	1,04	1,01	0,35
	2,0	0,85	1,37	2,6	1,05	>9	18,3	1,47	1,69	3,6	0,90	0,87
38A HC F32A	NN	>7	39	>24	258	NN	NN	>188	>73	>3	>138	>64
	NN	>0,85	37	>1,16	48	NN	>0,58	103	>82	>0,04	>81	>52
27A HC D52N	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	0,75	NN
	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	4,8	NN
27B HC D52N	NN	3,0	3,7	4,7	3,0	NN	0,25	4,1	1,83	7,0	10,4	7,4
	NN	7,2	6,3	4,6	8,1		1,91	8,4	6,7	17,0	9,9	7,0
33A HC Y53A	11,8	3,2	2,0	5,0	2,3	>24	24	0,94	2,9	6,9	1,44	2,5
	7,8	1,83	1,33	4,3	0,83	16,3	34	1,59	4,6	17,9	1,77	1,66
	10,5	0,96	1,27	7,8	1,71	>9	>65	1,50	4,3	12,4	1,20	3,8
38A HC H53A	NN	3,2	0,75	0,18	0,85	NN	NN	0,83	0,64	0,09	0,71	0,30
	NN	0,24	0,58	0,28	0,73	NN	>0,58	1,65	0,84	0,01		1,15
	NN	1,72	1,07	1,77	1,56	NN	<0,173	2,0	1,29	0,64	1,46	2,4
33A HC L54T	1,60	1,81	1,18	2,0	1,01	8,1	5,9	1,49	3,0	0,84	1,48	1,43
	3,7	0,73	4,6	1,02	0,71	1,83	0,92	1,23	2,7	1,29	0,59	1,08
27B HC T55G	NN	6,2	11,4		18,8	NN	>1,14	5,2	13,5	>114		>159
	NN	10,0	5,8	22	11,5	>480	>7,2	7,3	26	>82	6,0	27
33A HC E55T	0,96	1,41	1,51	1,63	1,07	2,9	2,0	0,44	0,92	0,75	1,40	0,79
	1,38	0,62	1,38	0,71	0,66	1,12	0,41	0,70	0,47	0,74	0,70	0,76
33A HC E55A	1,62	2,1	1,53	1,48	2,4	>24	22	1,23	1,26	4,9	2,6	1,63
	1,55	0,42			0,50	>9	15,9	0,59	0,87	3,7	1,15	1,10
		0,73	0,88	2,2	1,09						0,44	0,48
33A HC E55G	5,4	4,0	0,82	3,5	2,2	>13	14,2	0,56	0,75	1,87	0,77	1,07
		2,8	1,53	2,9	2,6	>4	9,4	1,01	1,10	16,5	1,45	1,37
38A HC Q55A	NN	3,7	0,76	4,3	9,7	NN	NN	2,6	1,11	1,53	4,4	6,0
	NN	0,24	0,79	0,23	5,5	NN	>0,58	2,7	0,99	0,01	2,9	2,5
38A HC Q55G			10,6	>7	198	NN	NN	9,8	3,2	>1	19,3	14,8
		>4	1,88	34	90	NN	NN	15,8	2,8	NN	16,7	10,8
33A HC N56S	1,53	1,14	1,54	1,60	1,27	>8	2,23	0,83	1,77	0,42	1,26	0,64
	2,2	0,73	2,7	1,02	0,68	1,09	0,86	0,97	0,72	0,86	0,73	0,85
33A HC N56A	1,48	0,94	1,57	1,79	1,41	>24	3,7	1,08	0,70	0,80	1,17	0,86
		1,25	2,5	2,8		23	10,9	14,0	1,61	1,66		
	1,19	1,12	0,93	2,3	0,25	10,6		0,98	0,75	2,3	0,84	0,39
	1,30	0,90	1,16	1,54	0,92	>9	5,5	1,04	1,05	1,40	0,73	0,93
27B HC S57A	NN	>12,6	2,3	>11,1	7,9	NN	>1,14	13,1	4,1	>114	32	22
	<0,966	>19,1	7,0	39	18,6	>480	>7,2	17,6	6,2	50	7,1	5,2
27B HC T55G S57A	NN	NN	>39	NN	1,75	NN	NN	2,8	8,5	>12,7	9,0	15,8
	NN	1,30	NN	4,4	12,2	188	3,0	4,0	97	>82	8,4	37
33A HC V57S	6,2	4,8	1,37	4,6		2,7	8,0	1,40	5,4	1,98	2,3	3,0
	14,3	2,9	5,4	2,5	1,23	2,9	2,0	2,8	4,6	2,7	2,8	3,4
33A HC V57A	8,2	9,6	1,26	3,1	0,99	7,6	6,5	1,19	2,4	4,2	0,73	1,91
		5,0	2,4	2,8	2,88	2,6	6,4	2,1	4,8	13,6	1,16	3,9
33A HC R64A	1,19	1,65	0,98	1,34	0,96	1,79	1,79	1,27	1,67	0,50	1,28	1,38
	2,6	1,22	1,23	1,99	1,21	2,4	1,21	1,79	1,07	1,62	1,38	3,8
27A HC S65R	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	1,09	NN
27B HC R65S	NN	NN	1,18	0,57	1,55	NN	NN	1,04	1,02	1,15	1,04	0,39
	NN	<0,658	0,71	<0,651	0,56	NN	NN	1,11	1,46	0,27	1,14	1,28
33A HC F67I	2,9	3,1	1,80	2,6	2,1	7,6	7,4	3,0	2,7	2,6	2,7	3,2
	11,2	2,1	9,7	1,91	1,05	3,7	2,2	1,56	3,3	3,5	1,22	2,8
27B HC N68A	NN	NN	13,9	>1,2	9,37	NN	NN	6,2	2,8	>3,4	8,3	14,6
	NN	NN	17,6	NN	8,02	NN	NN	8,8	17,1	>1,29	14,0	33
33A HC T68N	>6	>698	>62	>231	286	>8	>173	>591	>16	>155	>281	>62
	>27	271	>27	>119	33	>198	>50	93	>31	>201	61	>174
38A HC T68A	NN	>7	2,1	>24	>301	NN	NN	12,7	6,2	>3	28	30
	NN	>0,85	2,5	2,6	22	NN	>0,58	14,2	2,5	>0,04	24	24
27B HC S70A	<0,258	<0,171	1,33	NN	1,12		<0,467	0,77	0,36		0,66	1,75
		<0,637	0,35	<0,365	0,58	NN	<0,895	0,22	0,66	<0,107	1,05	1,09
33A HC S70A	1,90	1,47	0,90	2,3	1,20	5,9	5,8	0,68	1,26	1,84	0,83	0,83
		0,58	0,71	0,61	0,44	0,95	2,7	0,55	0,83	1,40	0,47	0,54

	Rapport d'IC50 anticorps mutant / anticorps WT											
	KNH1144	92RW020	SC422	ADA	SF162	HXB2	93IN905	DU156	DU422	V0-15	V12-33	V21-20
33A HC K75A		3,4	2,7	3,1	4,7	>24	23	5,3	8,3	6,3	3,0	4,3
			21			346						
	7,6	1,94	1,92	4,4	1,55	131	9,7	3,5	4,3	8,6	1,84	0,92
	7,8	2,7	2,7	7,7	1,29	>9	17,2	3,9	6,0	5,4	1,18	2,2
27A HC N76K	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	2,8	NN
27B HC K76N	NN	NN	0,77	>1,2	1,08	NN	NN	1,87	1,41	1,19	1,33	2,3
	NN	NN	1,17	NN	0,78	NN	NN	2,2	1,72	0,66	1,83	1,84
33A HC N76A	1,69	0,82	1,61	1,85	1,32	>24	5,3	1,12	2,1	2,4	1,33	1,44
			1,90					3,3			1,38	
	1,72	0,90	0,95	2,2	0,59	12,9	3,7	0,74	0,89	4,0	1,05	0,61
27A HC E81K	NN	NN	<0,49	NN	<0,122	NN	NN	<0,132	<0,203	NN	0,77	<0,646
27B HC K81E	NN	NN	43	>1,2	18,5	NN	NN	10,4	18,6	>3,36	35	48
	NN	NN	29	NN	10,2	NN	NN	9,7	30	>1,29	71	>157
27B HC K81E Y83L	NN	>19,1	>39	21	22	>480	>7,18	18,2	>44	>82	14,7	43
	NN	8,0	16,9	>11,07	13,0	NN	>1,14	13,1	51	>114	52	>159
38A HC R81K		0,77	2,9	1,34	4,0	NN	<0,398	2,4	1,70	0,50	2,1	1,09
		0,36	0,80	1,38	0,81	NN	<0,179	1,03	0,98	<0,193	1,02	1,19
27B HC L82F	<0,302	<0,182	0,55	<0,216	0,28	NN	NN	0,24	0,33	0,05	0,50	0,32
					0,41	NN	NN	0,12	0,88	<0,226	0,60	1,25
27B HC L82F Y83F	NN	<0,37	1,06	<0,08	0,58	NN	NN	0,44	0,43	0,64	0,67	1,39
			0,28	<0,11	0,38	NN	NN	0,23	0,72	NN	0,46	0,60
33A HC F82A	>6	24	16,4	16,7	8,1	>8	21	27	>16	24	5,6	21
	>27	14,5	>27	9,4	6,3	14,4	10,4	9,7	>31	35	3,3	39
27B HC Y83L	NN	<0,213	0,44	<0,151	0,30	NN	NN	0,95	0,53	0,26	2,2	0,78
	<0,13	1,04	<0,411	0,67	1,22	8,5	1,75	2,4	7,3	1,46	2,1	0,71
27B HC Y83F	<0,935	<0,147	1,58	<0,107	0,74	NN	<0,914	0,87	1,41	1,16	1,90	1,34
			0,44	<0,491	0,93	NN	NN	0,67	1,55	NN	0,62	2,1
33A HC F83A	>6	25	13,1	15,4	24	>8	64	79	>16	63	8,7	34
	>27	12,9	>27	9,6	8,5	20	14,5	6,0	>31	30	4,5	25
33A LC R24A	1,79	1,76	1,39	2,0	1,71	>24	8,1	1,12	1,81	2,3	1,66	1,13
							127	2,0	1,22	3,2	7,1	
	1,22	1,05	0,70	3,3	0,75	53	15,4	0,70	0,89	4,4	1,63	0,65
27B LC S26N	<0,088	0,03	0,39	0,06	0,25	<0,229	0,01	0,80	0,46	0,64	1,20	0,51
	<0,07	0,16	1,38	0,38	0,86	125	0,04	0,63	0,55	0,28	1,03	0,23
33A LC N26A	0,67	0,40	0,49	1,03	0,32	3,2	4,7	0,47	0,59	1,12	0,72	0,27
	0,48	0,38	0,40	1,10	0,43	3,5	2,5	0,40	0,56	0,71	0,45	0,48
38A LC S26N	NN	1,86	0,81	0,64	1,77	NN	<0,535	0,83	0,39	0,41	1,37	1,24
	NN	0,35	0,59	0,34	0,50	NN	0,96	0,55	0,55	0,15	0,70	0,97
	NN	1,94	1,29	1,01	0,98	NN	NN	1,88	1,00	>2	1,28	2,6
33A LC T30A	>15	40	9,3	30	4,8	>24	>42	9,8	>25	>135	5,0	>97
	>10	53	10,6	35	11,2	>18	>83	22	>43	>177	2,1	116
33A LC D31A	>15	274	70	>102	74	>24	>42	28	>25	>135	4,7	>97
	>10	312	77	202	33	>18	>83	72	>43	>177	3,3	194
33A LC N54L	0,44	1,71	0,71	2,5	2,2	0,46	1,64	2,0	0,83	1,18	1,75	1,20
	1,28	1,22	1,13	1,40	0,63	1,40	1,20	1,23	0,94	0,93	0,86	0,67
38A LC N71A	NN	0,12	0,44	0,15	0,22	NN	0,22	0,37	0,22	0,02	0,30	0,44
	<0,203	0,05	0,72	0,03	0,21	NN	<0,563	0,52	0,65	0,10	0,34	0,42
38B LC N71A	NN	1,63	1,04	0,88	1,67	NN	1,06	0,65	0,88	0,50	0,03	
	1,28	1,56	0,92		2,0	NN	0,96	0,45	0,62	0,58	0,83	0,45
	>6	6,8	0,60	2,6	2,1	NN	0,93	0,99	1,38	2,3	1,92	0,94
33A LC N75A	0,97	0,47	0,63	0,98	0,39	1,36	2,7	0,61	0,94	1,77	0,77	0,38
	0,61	0,66	0,59	1,94	0,51	1,66	2,8	0,59	0,71	1,30	0,56	0,60
33A LC N26A N75A	0,59	0,38	0,38	1,15	0,42	3,7	4,0	0,43	0,35	1,09	0,60	0,25
	0,51	0,30	0,42	1,07	0,53	4,9	0,49	0,43	0,57	0,78	0,47	0,46
27A LC F84S	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	0,93	NN
27B LC S84F	<0,533	NN	0,92	>1,2	0,45	NN	NN	0,41	0,59	0,53	0,58	0,48
	NN	NN	0,58	NN	0,26	NN	NN	0,25	1,68	0,39	0,85	0,73
27A LC K88F	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	0,76	NN
27B LC F88Y	NN	<0,59	1,32	0,43	1,27	NN	NN	1,47	0,82	0,84	1,02	0,40
	NN	<0,911	1,22	NN	1,29	NN	NN	1,61	2,2	0,54	2,2	1,56
27B LC T94D	<0,244	<0,152	1,22	0,42	1,49	NN	NN	1,14	1,07	0,36	1,84	1,24
	NN	<0,555	0,98	NN	0,51	NN	NN	1,00	2,6	0,62	2,2	1,27
33A LC S94A	1,08	0,64	0,87	0,64	1,22	12,7	5,8	1,02	0,95	1,79	1,68	1,31
	0,45	1,00	1,02	0,90	1,30	1,41	8,4	1,26	0,80	1,77	2,1	
	0,66	0,54	0,87	1,69	0,67	5,5	2,6	0,82	0,77	1,62	0,58	0,72
33A LC S95A	2,4	7,8	5,9	5,0	8,5	>24	12,5	3,3	5,3	7,4	7,5	5,1
	0,56	0,49	0,72	0,71	0,80	69	7,8	1,22	0,50	1,90	0,40	1,58

Figure III-12 : Cartographie du paratope. Rapport d'IC50 de la neutralisation par l'anticorps mutant sur la neutralisation par l'anticorps WT pour les 12 virus du panel. Les rapports supérieurs à 20 sont en rouge, entre 2 et 20 en orange et inférieurs à 0,5 en vert. NN en gris : virus non neutralisé par l'anticorps mutant et l'anticorps WT.

- **Résidus 53 à 57 du CDRH2**

Une région de forte activité d'hypermutations somatiques se situe au niveau des résidus 53 à 57 de la chaîne lourde dans le CDRH2. Ces résidus sont exposés à la surface de l'anticorps sur le premier brin bêta sous-jacent à la boucle CDRH3. A la position 55, une glycine est utilisée par tous les anticorps précoces. Les mutations 27B HC T55G et 38A HC Q55G ont diminué la neutralisation sur une vaste majorité de virus testés. Les mutations de résidus Y53, E55, N56 et V57 de 33A ont eu des effets sporadiques, mais semblaient participer à la neutralisation de 33A sur quelques virus. La mutation 27B HC S57A est une mutation de réversion à 27A. Elle diminuait la neutralisation par 27B sur l'ensemble des virus testés. La double mutation avec T55G n'avait pas un effet plus marqué. Finalement, les résidus en position 53, 55, 56 et 57 semblent jouer un rôle dans la neutralisation.

- **Résidus 81 à 83 du FR3 de la chaîne lourde**

La région du FR3 de la chaîne lourde entre les résidus 81 et 83 est plus éloignée de l'apex et de la boucle CDRH3. Elle se situe sur le troisième brin bêta sous-jacent à la boucle CDRH3. Les résidus mutent beaucoup, particulièrement aux positions 82 et 83, mais des phénylalanines sont adoptées aux deux positions par tous les anticorps matures sur deux branches de l'arbre phylogénétique. 27B utilise également un acide aminé aromatique, une tyrosine, en position 83. Les résidus sont disposés de part et d'autres du brin bêta de telle sorte que les chaînes latérales en positions 81 et 83 sont exposées à la surface tandis que la chaîne latérale du résidu 82 fait face vers l'intérieur de la protéine.

L'introduction de phénylalanine aux positions 82 et 83 de 27B améliorait modérément sa neutralisation. Réciproquement, la suppression des phénylalanines de 33A diminuait fortement sa neutralisation sur tout le panel. L'acide glutamique porté par 27A en position 81 n'était pas favorable à sa neutralisation. Sa mutation en lysine plus commune dans la lignée améliorait la neutralisation. Réciproquement, la mutation 27B HC K81E diminuait la neutralisation. La double mutation avec Y83L revenant au résidu en 27A était aussi néfaste à la neutralisation de 27B. En revanche 38A tolérait aussi bien une arginine qu'une lysine en position 81, les deux acides aminés étant tout deux chargés positivement.

En conclusion, les effets des mutations sur cette région sont francs, et concordent à montrer qu'elle est importante pour la neutralisation. Etant donné que les structures cristallographiques des anticorps 27A, 27B et 33A sont identiques dans cette région indépendamment des résidus portés, il semble peu probable que ces mutations aient un effet indirect sur la structure des anticorps. Les résidus sont donc certainement en proximité étroite avec la protéine d'enveloppe, bien qu'ils soient positionnés latéralement à l'apex et à une trentaine d'angströms.

▪ Site de glycosylation N68 de 27B

27B est le seul anticorps de la lignée à porter un site de glycosylation en position N68 de la chaîne lourde, dans le FR3. La structure cristallographique ne permettait pas de dire avec certitude que l'anticorps portait effectivement un glycane à cette position, la densité électronique étant mal définie comme c'est souvent le cas d'éléments très flexibles ou hétérogènes.

La mutation 27B HC N68A supprimait le site de glycosylation et diminuait la neutralisation. Cependant, la mutation 27B HC S70A qui supprimait également le site de glycosylation ne diminuait pas la neutralisation. Ainsi, la perte d'un glycane à cette position n'expliquait pas la perte de fonction de 27B. Par ailleurs, la mutation 27B HC N68D qui ajoutait une charge négative à la chaîne latérale de cette position, diminuait également la neutralisation. Ceci tend à suggérer que le résidu porté en position 68 doit être une asparagine, mais ne doit pas être glycosylé pour assurer une fixation optimale de 27B.

De plus, la mutation 38A HC T68A, qui ne concernait pas un site de glycosylation, mais seulement le résidu thréonine en position 68, diminuait la neutralisation de 38A. L'introduction d'un site de glycosylation dans 33A par la mutation 33A HC T68N impactait sévèrement la neutralisation. Si on modifiait le résidu en position 68 sans introduire de site de glycosylation, par la double mutation 33A HC T68N S70A, la neutralisation était également impactée, tandis que la mutation 33A HC S70A seule n'avait pas d'effet. Ainsi, sur les anticorps 38A et 33A, la thréonine en position 68 semble importante pour la neutralisation.

En conclusion, le résidu asparagine adopté par 27B en position 68 et le résidu thréonine conservé entre certains anticorps précoces et les anticorps matures à cette position, semblent importants à la neutralisation par ces anticorps. Le site de glycosylation en position 68 de 27B ne semble porter de glycane.

▪ Sites de glycosylation

Le grand nombre de sites de glycosylation des anticorps est une spécificité de cette lignée et pourrait avoir un rôle dans l'interaction avec la protéine d'enveloppe. Le site de glycosylation en N68 de 27B ne semble pas être utilisé comme démontré ci-dessus. 27B porte également un site de glycosylation en position N26 de la chaîne lourde. Contrairement au glycane en position N68, celui en position N26 est visible dans la structure cristallographique de 27B. Le premier résidu GlcNac est lié à l'asparagine N26. La mutation N26A n'avait pas d'effet sur la neutralisation de 27B. La mutation 38B HC N26A n'avait pas d'effet non plus. Situé également à une trentaine d'angströms du sommet de la boucle CDRH3, ce glycane est à l'opposé de la région de la FR3 aux positions 81 à 83, précédemment montrée comme importante pour la neutralisation. L'absence d'effet de la

suppression de ce glycane est en accord avec un modèle où l'angle d'approche de l'anticorps se fait par une face latérale de la chaîne lourde.

Certains anticorps précoces, dont l'UCA, portent un site de glycosylation en position N52 de la chaîne lourde. L'effet de la suppression de ce glycane sur la neutralisation n'a pas été testé, car les anticorps qui le portent sont très peu neutralisants. En revanche, l'ajout d'un site de glycosylation à cette position sur 27A et 27B a été testé. La mutation 27B HC D52N diminuait légèrement la neutralisation. L'effet de la mutation 27A HC D52N n'a pu être déterminé que sur le virus autologue de 10 mpi qui est le seul à être neutralisé. Il n'y avait pas d'impact de la mutation sur la neutralisation de ce virus. En conclusion, un glycane à cette position ne semble pas être bénéfique à la neutralisation des anticorps qui le portent.

Les glycosylations de la chaîne légère concernent quatre sites. L'anticorps 33A est glycosylé en position N26 et N75. Ces deux glycanes sont visibles sur la structure cristallographique et sont des GlcNac2Man2Fuc, c'est-à-dire des structures d'oligomannoses probablement tronquées et portant un fucose proximal sur le premier résidu N-acétylglucosamine. Leur suppression par mutations simples ou double 33A KC N26A N75A n'avait pas d'effet sur la neutralisation par 33A. L'addition du site de glycosylation en position N26 sur 38A n'avait pas d'effet. Cependant, l'ajout du site sur 27B par la mutation 27B KC S26N améliorait la neutralisation d'un facteur de 10 en moyenne. 93IN905 était neutralisé avec une IC50 réduite de 40. Le résidu S26 se situe entre 25 et 32 angströms de tous les autres résidus cartographiés comme importants pour la neutralisation de 27B (D52, T55, S57, N68, résidus 81 à 83 sur la chaîne lourde) ainsi que le sommet de la boucle CDRH3. La présence d'un glycane à la surface de la chaîne légère à proximité de la chaîne lourde pourrait modifier la conformation du paratope et améliorer l'interaction de 27B avec le trimère d'enveloppe. Cependant ce même glycane n'a pas de rôle dans l'interaction de 33A avec la protéine d'enveloppe. Ceci est à nouveau cohérent avec le modèle d'une interaction majoritairement par la chaîne lourde.

Le glycane de la chaîne légère en position N71 est porté par les deux anticorps matures 38A et 38B. Sa suppression était sans effet sur la neutralisation par ces deux anticorps.

- **Base de la boucle CDRH3 au niveau de la chaîne légère**

Dans la structure de 33A, les cystéines C33 et C92 forment un pont disulfure entre le CDRL1 et le CDRL3 à la base de la boucle CDRH3. Ces cystéines sont également présentes chez l'anticorps précoces 22A, mais chez aucun autre anticorps de la lignée. Cependant, dans les structures de 27A et 27B, les boucles CDRL1 et CDRL3 adoptent la même conformation que dans 33A, en l'absence d'un pont disulfure. La mutation de l'une ou l'autre de ces cystéines impactait très sévèrement la neutralisation par 33A.

A proximité, la boucle CDRL1 entre les positions 31 et 33 est très rapidement mutée dans l'évolution de la lignée. Les mutations 33A KC T30A et D31A réduisaient fortement la neutralisation par 33A.

La sérine en position S95 de la chaîne légère de 33A est à l'interface avec la chaîne lourde. Elle forme probablement une liaison hydrogène avec l'asparagine N60 de la chaîne lourde située dans une boucle entre le premier et le deuxième brin bêta sous-jacent à la boucle CDRH3. Cette région comprend des acides aminés dont la mutation impactait la neutralisation de façon importante (résidus 55, 56, 57 et 68). La mutation 33A KC S95A diminuait légèrement la neutralisation, probablement parce qu'elle perturbait la conformation de la chaîne lourde dans cette zone.

- **Mutations autour de la boucle CDRH3**

Sur les structures de 27A et 33A, une phénylalanine ou une tyrosine en position 32 de la chaîne lourde semble stabiliser deux résidus arginines aux positions 97 et 100 de la chaîne lourde, placées toutes deux de part et d'autre à 4 angströms. Ces résidus sont à la base de la boucle CDRH3. Sur la structure de 27B en revanche, ces trois résidus ne sont pas impliqués dans les mêmes interactions. Chez 38A, la mutation de la phénylalanine 38A HC F32A diminuait fortement la neutralisation, de façon cohérente avec une déstabilisation de la boucle CDRH3. Chez 33A, la mutation Y32F n'avait pas d'impact, suggérant que les deux acides aminés aromatiques sont capables de stabiliser les arginines.

Partie 3) Discussion

La cartographie du paratope a permis de mettre en évidence des résidus importants pour la neutralisation par les anticorps et potentiellement impliqués dans une interaction directe avec la protéine d'enveloppe. Ainsi, la position 32 du CDRH1, les résidus 53 à 57 du CDRH2, le résidu 68 et les résidus 81 à 83 du FRH3 et la position 31 du CDRL1 semblent faire partie du paratope.

De plus, une représentation de notre collaborateur au Scripps, Rotimi Omorodion, montre que certains des résidus caractérisés comme importants sont positionnés à proximité des cavités chargées négativement à la base de la boucle CDRH3, dont on peut soupçonner qu'elles sont des zones d'interaction avec la protéine d'enveloppe, ce qui conforte leur probable implication dans le paratope (Figure III-13).

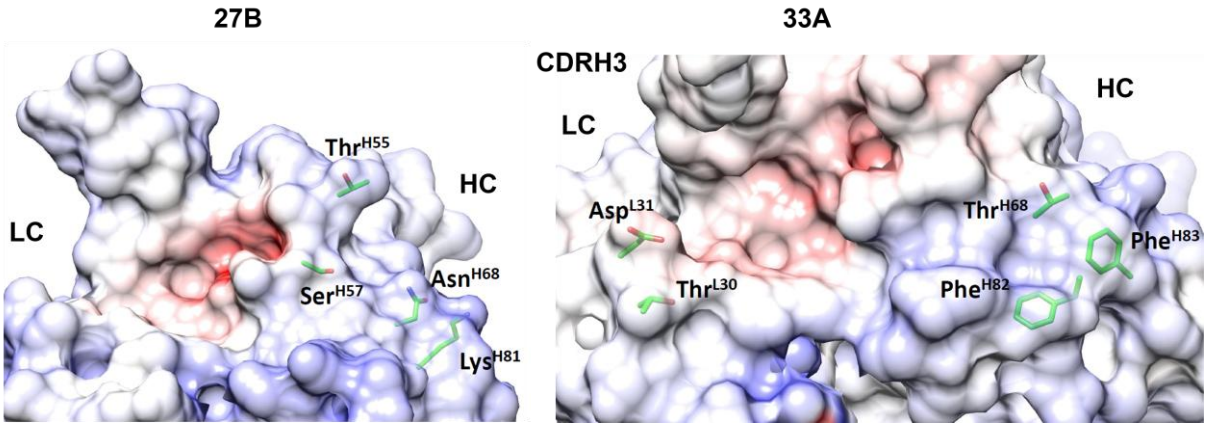


Figure III-13 : Cartographie de residus du paratope dans la structure de 27B et 33A en représentation de surface avec le potentiel électrostatique.

En revanche, l'anticorps 27A possède des mutations qu'il ne partage pas avec les autres anticorps isolés et qui sont néfastes à la neutralisation. C'est le cas des résidus A57, E81 et L83 de la chaîne lourde. Ceci pourrait indiquer que l'anticorps 27A fait partie d'une impasse évolutive, comme le suggère aussi le fait que cette branche n'évolue plus après 27 mpi (voir Figure III-11). Ceci illustre que toutes les hypermutations somatiques acquises n'apportent pas un gain de neutralisation hétérologue.

Cette cartographie montre aussi la divergence évolutive des anticorps de la lignée et indique que les anticorps matures ont développé des modes d'interactions différents avec la protéine d'enveloppe. Cependant, quelques mutations sont communes aux anticorps matures 38A et 38B et à l'anticorps mature 33A appartenant à des branches évolutives distinctes. Ainsi, les phénylalanines 82 et 83 de la chaîne lourde sont acquises par les trois anticorps matures et sont bénéfiques à la neutralisation.

Par ailleurs, la cartographie a également revelé que les glycanes portés par ces anticorps sont éloignés du paratope et ne jouent pas un rôle important dans leur activité neutralisante. Le site potentiel de glycosylation N68 de la chaîne lourde de 27B n'est probablement pas glycosylé.

- **Alignement de 33A avec PGT122 en complexe avec le SOSIP BG505**

L'alignement des chaînes lourdes et légères des fragments Fab de 33A et PGT122 dans la structure cristallographique du complexe entre PGT122 et le SOSIP BG505 a permis de proposer un modèle d'interaction (Figure III-14). Ce « docking » grossier et manuel ne respecte pas les règles biochimiques d'interactions, mais permet de proposer un modèle où les données de cartographies de l'épitope et du paratope sont portées au regard l'une de l'autre. Ce modèle sera précisé ou infirmé par de nouvelles expériences de cartographies ou par l'obtention de la structure à haute résolution de 33A en complexe avec une protéine d'enveloppe.

L'alignement de PGT122 et 33A a montré un écart au niveau de l'angle du CDRH3 par rapport au reste de l'anticorps. En opérant une rotation manuelle de 33A pour aligner les deux CDRH3 proches de la V3 et une rotation de la chaîne lourde vers le centre du trimère, on a rapproché les résidus cartographiés comme faisant partie du paratope et de l'épitope. Dans ce modèle, la chaîne lourde serait en interaction très rapprochée avec la protéine d'enveloppe sur toute sa surface opposée à la chaîne légère, au niveau du feuillet bêta sous-jacent à la boucle CDRH3. Le CDRH3 serait en interaction avec le glycane N332 par ses acides aminés aromatiques Y104, Y106 et W107 qui pourrait former des interactions hydrophobes avec les mannoses, d'une façon très similaire à PGT122. Le résidu D105 à la pointe de la boucle pourrait former une liaison avec les résidus protéiques de la boucle V3. Dans cette orientation, la région de la chaîne légère aux alentours du résidu 31 ne serait pas très éloignée des derniers mannoses du glycane N332 et pourrait également entrer en interaction. Sur la chaîne lourde, les résidus 68 et 81 à 83 seraient proches du glycane N156. Le glycane N301 serait quant à lui plus proche de la région du CRDH2 entre les résidus 54 et 57. Il pourrait même être stabilisé par le glycane de l'anticorps de la chaîne légère en position N26. Cet angle d'approche serait plongeant par rapport à l'axe trimérique et respecterait l'encombrement stérique des autres protomères. La boucle CDRH3 formerait un angle droit avec l'axe trimérique et descendrait jusqu'à contacter la base de la boucle V3.

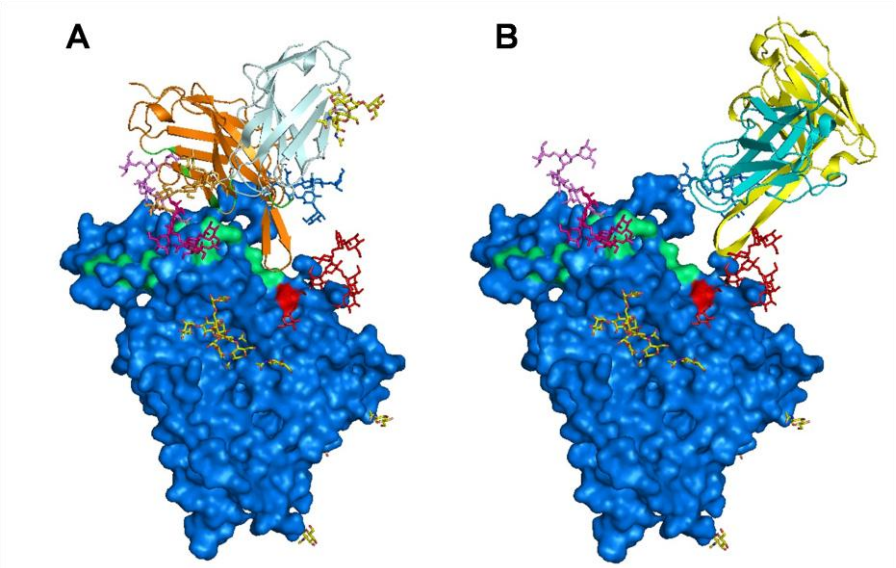


Figure III-14 : A) Modèle de 33A en interaction avec une sous-unité gp120 de BG505 SOSIP (bleu). L'apex et le centre du trimère sont en haut et à gauche. Chaîne lourde de 33A (orange), chaîne légère de 33A (bleu clair), glycane N332 (rouge), glycane N301 (rose vif), glycane N156 (rose clair), glycane N137 (bleu), résidus cartographiés de l'épitope et du paratope (vert). B : Structure du complexe de PGT122 et du SOSIP de BG505. PDB : 4NCO. Chaîne lourde de PGT122 (jaune), chaîne légère de PGT122 (turquoise)

IV. TRAVAUX SUR LE DONNEUR PC94

Partie 1) Données préliminaires

▪ Le donneur neutraliseur d'élite PC94

Le donneur PC94 a été identifié comme un donneur d'intérêt dans l'étude de la réponse neutralisante au sein de la cohorte du Protocole C *(Landais, Plos Pathog, 2016).* Ce donneur est infecté avec un VIH-1 de sous-type D dont la charge virale se maintient au-dessus de 30 000 copies/mL sur toute la période du suivi de l'infection de plus de 6 ans (Figure IV-1).

L'activité neutralisante du sérum de ce donneur contre le panel de 6 virus hétérologues a été mesurée à 9 temps après la date estimée d'infection de 24 à 78 mois post-infection (mpi) (Figure IV-1). Un score de neutralisation compilant le nombre de virus neutralisés sur un panel de 6 virus et les ID50 correspondantes a été calculé selon la méthode décrite par Simek et al. *(Simek, J Virol, 2009).* Pour rappel, un score supérieur à 1 prédit une neutralisation de plus de 50% des virus sur de plus larges panels. Le sérum de PC94 ne montrait pas d'activité neutralisante hétérologue à 24 mpi. L'activité neutralisante hétérologue apparaissait à 30 mpi avec un score modéré de 0,42, mais dépassait le seuil de score de neutralisation de 1 à partir de 36 mpi. Le score diminuait ensuite entre 54 et 60 mpi avant d'augmenter à nouveau et de dépasser 2. Les ID50 sur 93IN905 et IAVIC22, deux virus de sous-type C, étaient particulièrement élevées, 1/1783 et 1/1340 à 78 mpi respectivement.

Afin de confirmer ces données qui suggéraient que PC94 était un très bon neutraliseur, les sérums de 36, 48 et 60 mpi ont été testés sur un panel de 37 virus hétérologues, développé dans le laboratoire *(Landais, Plos Pathog, 2016).* Les scores de neutralisation calculés sur ce panel, légèrement plus élevés que les scores calculés sur 6 virus, progressaient régulièrement sur la période étudiée. La baisse de neutralisation à 60 mpi observée sur le panel de 6 virus a été infirmée, puisque les résultats portant sur un plus large panel prévalent. Le score de 2,54 calculé sur le panel de 37 virus à 60 mpi classait PC94 comme second meilleur neutraliseur du Protocole C. A 36 mpi, 62 % du panel de 37 virus était neutralisé avec des ID50 supérieures à 100 et atteignant une moyenne de plus de 1000. A 60 mpi, 82 % des virus étaient neutralisés. Cette largeur de spectre est remarquable. Les sous-types B et C largement représentés dans ce panel, semblaient particulièrement bien

neutralisés. Les virus de tiers 1 étaient tous neutralisés avec des ID50 très élevées de façon cohérente avec leur sensibilité à la neutralisation déjà démontrée *(Seaman, J Virol, 2010).* Si on omettait ces virus de tiers 1, le pourcentage de neutralisation était légèrement réduit, mais atteignait tout de même 77% à 60 mpi. Une activité neutralisante était observée pour 4 virus sur 5 de tiers 3 et sous-type B.

A

ID50 de neutralisation sur 6 virus

mpi	24	30	36	42	48	54	60	66	78
MLV	116	1	0	8	0	28	4	24	3
94UG103	1	58	41	64	98	89	79	133	82
92BR020	1	66	267	490	683	394	278	529	529
JRCSF	1	23	142	193	172	146	74	240	192
93IN905	1	161	735	778	1417	1386	553	1177	1783
IAVIC22	1	107	749	1139	1618	993	646	1897	1340
92TH021	1	59	81	81	59	55	59	65	117

B

ID50 de neutralisation sur 37 virus

Tiers	Sous-type	mpi	36	48	60
		MLV	ND	23	ND
1A	B	SF162	11713	13576	15587
1B	B	SS1196	6613	3670	6221
2	B	MN	1601	2887	11547
2	B	TRO	2402	3200	5495
1B	B	DH12	2218	6011	2759
1B	B	6535	2111	3608	2975
1B	C	93IN905	1874	3008	2263
2	B	92BR020	1117	1215	3010
2	C	DU156	1432	1443	2250
1B	B	HxB2	2268	691	1449
1B	B	BaL	457	1567	1538
3	B	JRFL	842	1370	1115
2	A	92RW020	415	804	1993
3	B	ADA	372	654	1579
2	C	IAVIC22	272	841	847
2	C	DU422	ND	605	ND
2	C	CAP210	330	926	411
2	C	ZM249	281	599	640
2	A	BG505	ND	495	ND
2	B	SC422	192	560	380
2	C	DU172	169	405	356
3	B	PV04	1	174	660
2	B	RHPA4	82	217	450
1B	B	89,6	134	207	315
2	B	CAAN	75	344	187
2	B	JRCSF	138	220	169
2	B	REJO	38	96	245
2	B	QHO692	62	92	211
2	C	ZM135	45	22	267
3	B	YU2	0	71	105
3	B	TRJO	3	93	74
2	A	KNH1144	ND	43	ND
2	B	WITO	1	4	82
2	C	ZM214	19	5	59
2	AE	92TH021	31	23	1
2	A	94UG103	1	3	1
2	C	CAP45	2	1	1
Pourcentage de neutralisation			62	70	82

C

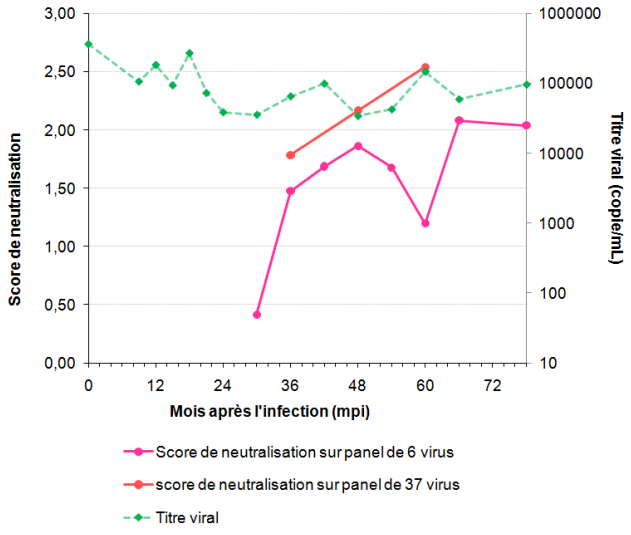


Figure IV-1 : Données préliminaires sur la neutralisation hétérologue à large spectre par le sérum du donneur PC94. (A) ID50 de neutralisation du panel de 6 virus et du virus MLV (contrôle négatif) par le sérum de 9 temps après infection. (B) ID50 de neutralisation du panel de 37 virus et du virus MLV par le sérum de 3 temps après infection. ND : Non déterminé (C) Scores de neutralisation sur le panel de 6 virus (rose), 37 virus (rouge), titre viral en copies/mL (vert).

- **La cartographie préliminaire de l'activité neutralisante du sérum de PC94 a révélé une spécificité pour le patch riche en mannose de la gp120**

Afin de déterminer la spécificité de cette réponse neutralisante, le sérum de PC94 a été soumis à une batterie de tests de cartographie (Figure IV-2)*(Landais, Plos Pathog, 2016).*

A

sous-type	mpi	gp120 Déplétion 92BR020	CD4bs Déplétion 92BR020 + b6	CD4bs Compétition RCS3	MPER Compétition MPER peptide	Glycanes Traitement kifunensine		Apex boucle V1/V2 N156A	N160K		K166A ou R166A		E169A ou K169A		K171A ou T171K	
		48	48	48	48	48	60	60	48	60	48	60	48	60	48	60
A	92RW020	3,61	2,51	0,91	0,87		0,23			0,55	0,47	0,34			0,62	0,52
A	94UG103															
B	92BR020	17,6	13,9	0,52	0,83	0,29	0,07		0,66	1,47	2,29	4,14	1,13	0,67	2,73	3,92
B	JRFL	10,5	2,72			0,26	0,34		0,32	1,93					7,2	8,1
B	BaL	1,96	1,29	1,13	1,07	1,01	1,02	1,40								
B	ADA			0,95	1,10	1,17	0,82		0,93	3,22						
B	TRO11	4,62	3,79			0,70	0,71			3,52						
B	JRCSF			NN	1,05					1,04						
B	89.6				1,12		0,68	1,46								
B	DH12					1,09	1,33		2,72	1,27						
B	YU2									1,87						
B	Hxb2	9,3	0,01	1,20	1,16											
B	SS1196						0,70									
B	REJO						1,03									
B	RHPA4						0,86									
B	SC422					0,60	0,27									
B	PV04						0,82									
B	BG505												3,07		1,84	
B	SF162			0,75	1,21											
C	IAVIC22	10,9	17,5	0,71	1,11	0,51	0,24		0,96	0,19					2,06	1,66
C	93IN905			1,00	1,06	0,91	1,65		0,69	0,49	2,42	3,00	2,68	0,83	0,78	0,40
C	DU156	10,3	13,1	0,88	0,95	0,63	0,60			0,36						
C	ZM249			1,12	0,73	0,17	0,25		0,32	NN						

B

sous-type	mpi	Glycanes boucle V3 / patch riche en mannose N332A			N234A	N241A	N295A	N301A	N362A	N386A	N392A	N332A +N295A	N332A +N301A	N332A +N339A	N332A +N386A	N332A +N392A
		36	48	60	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
A	92RW020	0,07	0,20	0,26								0,39		0,16		0,10
A	94UG103		NN													
B	92BR020	102	10,0	4,17	1,10	0,98	0,72	2,19	1,12	0,65	1,03	27	8,9		2,95	5,3
B	JRFL	0,98	1,01	0,12				0,67				179	0,26	0,25		0,20
B	BaL	NN	0,56	0,51												
B	ADA	0,94	1,17	3,23												
B	TRO11		4,53	1,59												
B	JRCSF	0,15	0,06	0,05												
B	89.6	0,81	NN	0,53												
B	DH12		7,9	4,48												
B	YU2			0,28												
B	Hxb2															
B	SS1196															
B	REJO															
B	RHPA4															
B	SC422															
B	PV04															
B	BG505															
B	SF162															
C	IAVIC22	13,9	9,1	1,78		0,73	0,83		1,80	1,17	0,84	561	523		73	148
C	93IN905		2,11	2,78												
C	DU156	3,09	1,84	8,4												
C	ZM249		NN	NN												

Ratio ID50 WT/Mutant				
	< 0,5	gain	2-20	perte
	0,5 - 2	neutre	> 20	forte perte
NN	WT et mutant non neutralisés			

Figure IV-2 : Cartographie préliminaire de la neutralisation par le sérum de PC94. Rapport d'ID50 de neutralisation du virus WT / virus mutant ou traité. Les résultats sont exprimés en rapport de la neutralisation du virus WT par rapport au virus muté ou traité, si la neutralisation du virus WT dépasse une ID50 de 100. Le rapport correspond à un facteur de diminution. Ainsi, un rapport de 2 indique que le virus WT est deux fois mieux neutralisé (avec une ID50 deux fois plus élevée) que le virus mutant ou traité. La neutralisation est donc impactée par la mutation en question. Autrement dit, la neutralisation est spécifique de la région en question. (A) Cartographie des régions gp120, CD4bs, MPER, apex et du traitement à la kifunensine. (B) Cartographie de la région du patch riche en mannose de la boucle V3.

- L'activité neutralisante du sérum a été adsorbée sur la gp120 recombinante monomérique

La gp120 monomérique recombinante de sous-type B 92BR020 a été conjuguée à des billes magnétiques puis utilisée pour dépléter en anticorps le sérum de PC94 de 48 mpi. La fraction déplétée perdait en moyenne 81 % de neutralisation sur 8 virus de différents sous-types, soit une réduction des ID50 d'un facteur moyen de 8,5 (Figure IV-2A). L'effet était le plus marqué sur la neutralisation du virus 92BR020 qui diminuait d'un facteur 17,6. Les anticorps du sérum neutralisant une large variété de virus se lient donc à la gp120 monomérique. L'activité neutralisante à large spectre dépend donc vraisemblablement d'anticorps ciblant la gp120 plutôt que la gp41, et qui ne sont pas dépendants d'une structure quaternaire du trimère d'enveloppe.

- L'activité neutralisante à large spectre de PC94 ne ciblait pas les régions du MPER, du CD4bs et de l'apex.

Bien que l'activité neutralisante du sérum ait été cartographiée sur la gp120, l'absence d'anticorps neutralisants à large spectre contre la région du MPER de la gp41 a été confirmée par l'absence de compétition avec un peptide du MPER pour la neutralisation de plusieurs virus. La cartographie a ensuite concerné deux régions conservées de la gp120. La gp120 modifiée RCS3, qui lie les anticorps neutralisants à large spectre ciblant le CD4bs, dont VRC01, n'entrait pas en compétition avec la neutralisation de 10 virus par le sérum de PC94 (Figure IV-2A). De plus, la perte d'activité neutralisante contre 8 virus était retrouvée par la déplétion du sérum sur gp120 monomérique recombinante 92BR020 en présence d'une concentration saturante de l'anticorps non neutralisants b6 ciblant le CD4bs. Cela a confirmé que les anticorps neutralisants à large spectre du sérum se liant à la gp120 ne ciblaient pas une région superposée au site de liaison de b6 sur le CD4bs. Finalement, les mutations en positions 156 à 171 qui inhibent spécifiquement la neutralisation des anticorps ciblant l'apex du trimère d'enveloppe avaient peu d'effets sur la neutralisation des sérums de 48 et 60 mpi et excluaient une forte spécificité pour la région de l'apex.

- Le traitement des pseudovirus avec l'inhibiteur de glycosydases kifunensine a augmenté l'activité du sérum.

Les tests de neutralisation sur virus produit en présence de kifunensine avaient pour but de d'apporter des informations sur l'implication de glycanes dans la neutralisation par les anticorps de ce donneur. La neutralisation par les sérums de 48 et 60 mpi des virus traités tendait plutôt à augmenter, avec une amélioration modérée, mais significative des ID50 pour 6 virus (rapports inférieurs à 0,5 soit une augmentation d'un facteur 2)(Figure IV-2A). Cela voudrait dire que les anticorps neutralisants à large spectre dans ce sérum ont une préférence pour des glycanes à 8 ou 9 mannoses comme les glycanes fréquemment portés par les sites de glycosylations du patch riche en mannose, ou que la présence de glycanes hybrides et complexes n'est pas favorable à la neutralisation.

- L'activité neutralisante contre certains virus était dépendante du glycane N332.

Enfin, les dernières expériences de cartographie visaient à détecter une spécificité pour la région riche en mannose autour du glycane N332 (Figure IV-2B). Ainsi, la majorité des anticorps neutralisants à large spectre ciblant cette région étaient impactés par la mutation N332A. Les sérums de 3 temps après infection ont donc été testés pour la neutralisation de 18 virus hétérologues portant cette mutation. Au moins 5 d'entre eux avaient des ID50 trop faibles pour pouvoir observer un effet de la mutation. La baisse d'ID50 était significative pour au moins deux temps après infection sur 5 virus (92BR020, DH12, IAVIC22, 93IN905 et DU156). L'effet le plus marqué était observé à 36 mpi sur 92BR020 contre lequel toute l'activité neutralisante était perdue. Deux virus supplémentaires avaient une perte d'ID50 sur un temps après infection (ADA, TRO11). Finalement, la mutation N332A diminuait la neutralisation de la moitié des virus seulement.

Par ailleurs, la mutation N332A augmentait la neutralisation de façon toute aussi significative pour 4 virus (92RW020, JRFL, JRCSF, YU2) avec une ID50 augmentée jusqu'à 20 fois pour la neutralisation de JRCSF par le sérum de 60 mpi. La neutralisation était donc améliorée pour un tiers des virus. L'augmentation de la neutralisation par la suppression d'un glycane peut indiquer un accès amélioré à l'épitope pour des anticorps ne neutralisant pas le virus WT et n'étant pas impliqués dans l'activité neutralisante à large spectre du sérum.

Sept sites de glycosylation environnant le glycane N332 ont également été mutés sur deux virus ayant montré une baisse de neutralisation due à la mutation N332A (92BR020 et IAVIC22). Aucune de ces mutations n'avait un fort impact sur la neutralisation par le sérum à 48 mpi. En revanche, les doubles mutations de N332 avec N295, N301, N386 ou N392 diminuaient la neutralisation sur les deux virus. Sur JRFL, seule la double mutation N332A-N295A diminuait la neutralisation. Mais le même virus voyait ses ID50 augmenter légèrement avec les doubles mutations N332A avec N301A, N386A ou N392A de même que 92RW020 sur quelques doubles mutations.

- **Les données préliminaires étaient insuffisantes**

Ces résultats en demi-teinte ne permettaient pas d'affirmer de façon formelle que la neutralisation hétérologue à large spectre chez ce donneur est uniquement due à des anticorps ciblant la région N332. Les expériences de criblages ont été effectuées sur de très nombreux donneurs et n'ont pas pu être répétées plusieurs fois. Les expériences de cartographie de l'activité du sérum de PC94 devaient donc être approfondies et validées afin de justifier une stratégie de tri des lymphocytes B basée sur la mutation N332A. Par ailleurs, une dernière validation aurait dû être effectuée : la déplétion différentielle de l'activité neutralisante à large spectre par une gp120 mutée au niveau du patch riche en mannose par rapport à une gp120 WT. Chez ce donneur, l'activité neutralisante à large spectre était déplétée par la gp120 monomérique recombinante WT. Si l'intégralité de cette activité cible de manière obligatoire ce glycane, la gp120 mutée ne devrait pas pouvoir dépléter l'activité du sérum.

Partie 2) Résultats

A) Cartographie de l'activité neutralisante à large spectre du sérum de PC94

- **L'activité neutralisante à large spectre ciblait la région du patch riche en mannose**

Pour préciser l'importance de la spécificité pour la région du patch riche en mannose, les sérums de PC94 de 3 ou 4 temps après infection (36, 48, 54 et 60 mpi) ont été testés pour la neutralisation d'une cinquantaine de virus mutants (5 simples mutants et 5 doubles mutants de glycanes sur un total de 10 virus)(Figure IV-3).

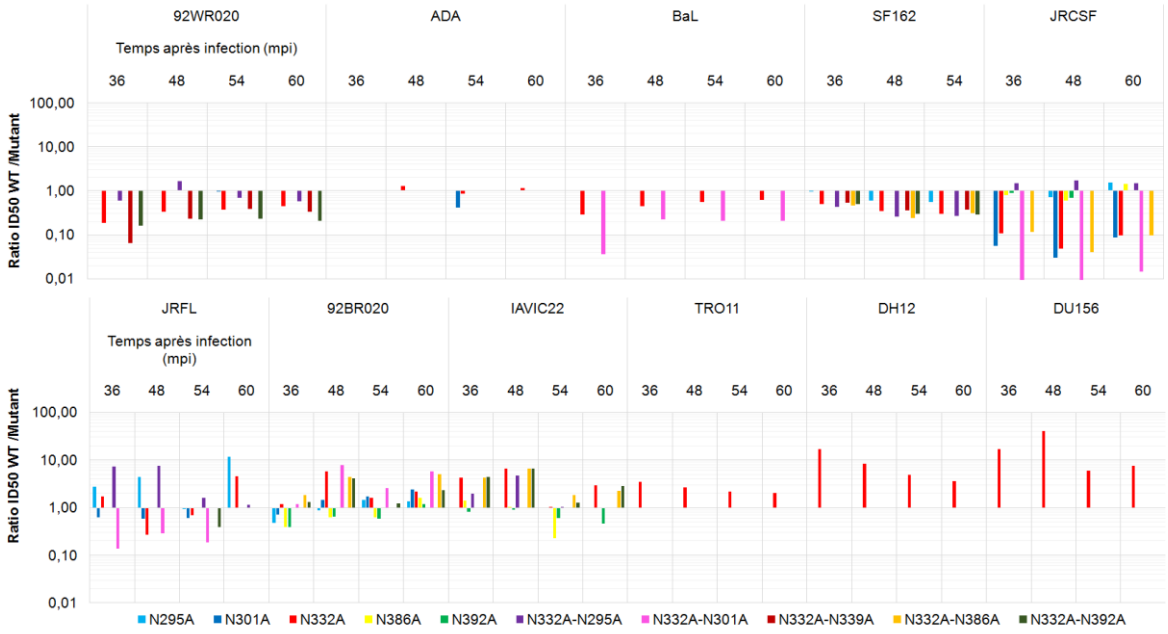


Figure IV-3 : Cartographie de l'activité neutralisante contre les glycanes de la région riche en mannose. Rapport d'ID50 de neutralisation des virus WT / virus mutant par le sérum de 36, 48, 54 et 60 mpi. Les bares d'histogrammes au-dessus de 1 indiquent une diminution de l'activité neutralisante contre le virus mutant, les barres d'histogrammes en-dessous de 1 indiquent une augmentation de l'activité neutralisante contre le virus mutant.

Comme précédemment observé sur les données préliminaires, les mutations de glycanes ont augmenté l'activité neutralisante sur certains virus et ont diminué l'activité neutralisante sur d'autres virus.

Ainsi, les mutations effectuées sur les virus 92RW020, BaL, SF162 et JRCSF ont amélioré les ID50 sur les 3 ou 4 temps après infection testés. En moyenne sur les 4 virus, la mutation N332A a augmenté l'ID50 d'un facteur 2. La double mutation N332A-N301A a eu le plus fort impact avec des ID50 augmentant en moyenne d'un facteur 10. Les doubles mutations ont eu plus d'impact que les simples mutations, à l'exception de la double mutation N332A-N295A qui a diminué la neutralisation de JRCSF, bien que de manière peu significative. Il faut noter que le virus SF162 de tiers 1A est particulièrement sensible à la neutralisation par la plupart des sérums de personnes infectées par le VIH. L'activité du sérum de PC94 contre ce virus ne déroge pas à la règle avec une neutralisation efficace à des dilutions supérieures au 10 000ème. Les mutations sur ce virus sont susceptibles d'augmenter encore sa sensibilité à de nombreux anticorps neutralisants peu les virus hétérologues et on ne peut pas utiliser les résultats obtenus avec ce virus pour conclure sur la spécificité de la neutralisation à large spectre chez ce donneur.

Contrairement aux virus précédents, la neutralisation de 6 virus (JRFL, 92BR020, IAVIC22, TRO11, DH12 et DU156) a été diminuée par les mutations testées. L'impact était le plus marqué pour la mutation N332A qui a diminué les ID50 par plus de 6 fois en moyenne sur les 6 virus et par près de 10 fois en moyenne sur les 3 derniers virus. Les doubles mutations n'ont pas eu d'effet plus marqué. Sur JRFL, la mutation N295A et la double mutation N332A-N295A ont eu des effets plus importants que la simple mutation N332A.

Ces résultats de cartographie ont confirmé qu'une partie au moins de la neutralisation hétérologue est dirigée contre la région du patch riche en mannose, et ont montré que le glycane N332 est plus important pour cette neutralisation que les glycanes N295, N301, N339, N386 ou N392. Cependant, l'impact de la mutation N332A n'était pas le plus marqué sur la souche IAVIC22, qui a été utilisée comme appât pour le tri des lymphocytes B mémoires.

B) Isolement des anticorps neutralisants et sélection des lignées d'anticorps d'intérêt

▪ La stratégie de tri des lymphocytes B mémoires a reposé sur des appâts gp120 monomériques

Afin, d'isoler les anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332, les échantillons de PBMC de trois temps après infection suivant l'apparition de la neutralisation à large spectre (48, 54 et 60 mpi) ont été soumis à un tri cellulaire par FACS. Les échantillons ont été marqués avec des anticorps spécifiques du sous-type cellulaire des lymphocytes B mémoires couplés à des fluorochromes. Le marquage comprenait également trois protéines recombinantes appât couplées à des fluorochromes. Deux d'entre elles étaient des gp120 monomériques WT de sous-type B et C issues des souches 92BR020 et IAVIC22 et la dernière était la gp120 monomérique IAVIC22 comportant la mutation N332A. Les lymphocytes B mémoires positifs pour la fluorescence des deux gp120 WT ont été triés à raison d'une cellule par puits de plaque 96 puits. La fluorescence de la gp120 IAVIC22 N332A a ensuite été utilisée comme indicateur de la spécificité de chaque lymphocyte B mémoire pour la région N332A.

▪ Une petite population de lymphocytes B reconnaissait spécifiquement le glycane N332

Au total, 523 lymphocytes B mémoires ont été triés à partir des trois temps après infection. L'intensité de fluorescence médiane pour la gp120 WT 92BR020 était environ 3 fois plus importante que pour la gp120 WT IAVIC22, elle-même 2,5 fois plus importante que pour la gp120 IAVIC22 N332A, suggérant la présence d'anticorps spécifiques de la région N332. Quarante-neuf lymphocytes B mémoires avaient une intensité de fluorescence de 1 pour la gp120 mutée, signifiant qu'elle n'a pas du tout été reconnue par ces lymphocytes.

Le rapport d'intensité de fluorescence pour la gp120 IAVIC22 WT par rapport à la gp120 IAVIC22 N332A était inférieur à 2 pour 21% de lymphocytes B mémoires, démontrant une absence de spécificité pour le glycane N332. Autrement dit, ces lymphocytes toléraient une mutation du glycane N332, soit parce qu'ils ciblaient une autre région de la gp120, soit parce qu'ils liaient la gp120 de manière non spécifique, soit parce qu'ils ciblaient la région du patch riche en mannose mais ne dépendaient pas du glycane N332. Les lymphocytes B mémoires avec un rapport entre 2 et 10, soit une spécificité faible pour le glycane N332, représentaient 57% des cellules triés. Le rapport supérieur à 10 concernait 22% des cellules triées dont 30 lymphocytes B mémoires avaient un rapport supérieur à 1000.

Bien que la majorité des lymphocytes B mémoires triés aient une spécificité faible ou nulle pour le glycane N332, ce tri a permis d'identifier une petite population de lymphocytes B mémoires dépendant fortement du glycane N332.

▪ Les gènes d'immunoglobulines ont été obtenus par amplification PCR sur cellule unique

Après reverse transcription des ARN messagers sur cellule unique, les gènes de chaînes lourdes et légères kappa et lambda ont été amplifiés à partir de la librairie d'ADN complémentaire par deux PCR successives à l'aide de mélange d'amorces spécifiques *(Tiller, J Immnol, 2008).* Les fragments d'ADN ont été identifiés sur gel d'agarose 2% et les puits positifs contenant un fragment amplifié à la taille adéquate ont été séquencés.

La moitié environ des puits ont permis de récupérer une séquence de chaîne lourde ou de chaîne légère kappa. Le rendement était plus faible pour la chaîne légère lambda, ce qui est cohérent avec une utilisation plus faible de cette chaîne dans le répertoire de lymphocytes B humains. Finalement, un couple de chaînes lourde et légère kappa a été identifié dans 151 puits et un couple de chaînes lourde et légère lambda a été identifié dans 110 puits.

▪ Les séquences des gènes d'immunoglobulines ont été soumises à la base de données IMGT

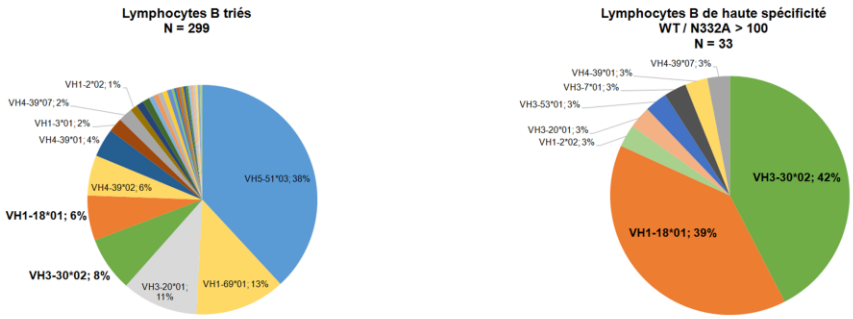
Les séquences des fragments de PCR ont été soumises à la base de données IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest) pour identifier les gènes de chaînes lourdes et légères utilisés parmi les nombreuses familles de gènes d'immunoglobulines humains.

Sur 299 séquences de chaîne lourde, 30 gènes de régions variables VH différents ont été identifiés parmi lesquels 7 étaient présents sur les 3 temps après infection triés et 8 supplémentaires étaient présents sur 2 temps après infection, bien qu'en nombre très réduit. Le gène VH5-51*03 était le plus fréquent et représentait 38 % des séquences de chaînes lourdes. Au moins 3 gènes de fragment J étaient utilisés par ces lymphocytes B, ce qui montrait qu'ils n'étaient pas tous parents. En revanche, les lymphocytes utilisant le gène JH4*02 étaient au nombre de 63 dont 38 utilisaient le gène de chaîne légère lambda LV1-51*01 et avaient des longueurs de CDRH3 et CDRL3 conservées. Il s'agissait très probablement d'une lignée d'anticorps partageant un ancêtre commun. Un usage conservé de gène de chaîne lourde était également partagé par 32 lymphocytes B (VH3-20*01, JH6*02, CDRH3 de 17 acides aminés) et 17 d'entre eux partageaient aussi le même usage de chaîne légère kappa (VK1D-12*01, JK3*01, CDRL3 de 10 acides aminés). Plusieurs autres lignées peu représentées ont pu ainsi être identifiées. Cependant, ces lymphocytes B

faisaient partie du groupe de très faible spécificité pour le glycane N332 à la surface de la gp120 IAVIC22, ce qui justifiait que leur activité neutralisante n'ait pas été investiguée.

Pour identifier une lignée susceptible d'avoir une activité neutralisante ciblant la région du patch riche en mannose, l'usage de fragment variable de chaîne lourde a été étudié en fonction du rapport d'intensité de fluorescence pour la gp120 WT par rapport à la gp120 mutée (Figure IV-4A). Les gènes les plus fréquents, VH5-51*03 et VH1-69*01, étaient exclusivement retrouvés dans la catégorie de lymphocytes B ayant une spécificité pour le glycane N332 faible avec un rapport inférieur à 10. La grande diversité de gènes très minoritaires était également dans cette catégorie. Les gènes les plus fréquemment utilisés par la catégorie des 33 lymphocytes B mémoires à haute spécificité pour le glycane N332 avec un rapport supérieur à 100 étaient VH3-30*02 et VH1-18*01 qui représentaient respectivement 42 et 39 % des lymphocytes de cette catégorie contre 8 et 6 % du total de lymphocytes B (Figure IV-4A). Il y avait donc un enrichissement dans ces deux usages de gènes qui correspondaient à deux lignées d'anticorps apparentés.

A



B

	Anticorps monoclonal	doublon	Temps d'isolement (mpi)	Intensité de fluorescence FACS 92BR020 gp120 WT	Intensité de fluorescence FACS IAVIC22 gp120 WT	Intensité de fluorescence FACS IAVIC22 gp120 N332A	Ratio d'intensité de fluo. WT vs N332A	Chaine lourde Gène VH	Gène JH	Gène DH	longueur CDRH3 (aa)	Mutation VHJH (% nt)	Mutation VHJH (% aa)	Chaine légère Gène VL	Gène JL	longueur CDRL3 (aa)	Mutation VLJL (% nt)	Mutation VLJL (% aa)
Lignée A	V48_9A		48	12327	3066	14	219			DH3-3*01		15,0	17,8	VK1-5*01		9	15,7	21,3
	V60_3A		60	3802	1075	1	1075			DH3-3*01		15,0	20,3	VK1-5*01		9	15,1	22,2
	V60_6A		60	4698	2400	62	39			DH3-3*01		15,3	20,3	VK1-5*01		9	16,6	24,1
	V48_11A		48	4295	1666	1	1666			DH3-3*01		15,3	25,4	VK1-5*03		10	14,8	18,5
	V48_14A	V48_8A	48	8960	4180	1	4180			DH3-3*01		15,5	26,3	VK1-5*03		10	15,4	19,4
	V48_8A	V48_14A	48	11221	3839	27	142			DH3-3*01		15,5	26,3	VK1-5*03		10	15,4	19,4
	V48_7A		48	18163	3798	40	95	VH1-18*01	JH6*02	DH3-3*01	23	15,8	19,5	VK1-5*01	JK1*01	9	15,7	22,2
	V54_1A		54	5076	2173	9	241			DH3-3*02		16,4	27,1	VK1-5*01		10	15,1	20,4
	V48_13A		48	5960	2485	53	47			DH3-3*01		16,7	25,4	VK1-5*01		10	13,8	19,4
	V48_2A		48	3639	1370	1	1370			DH3-3*02		16,7	25,4	VK1-5*01		10	13,5	18,5
	V60_5A		60	7262	2966	1	2966			DH3-3*01		16,7	26,3	VK1-5*03		10	16,6	21,3
	V60_10A	V60_15A	60	5298	3474	8	434			DH3-3*01		16,7	26,3	VK1-5*03		10	16,9	21,3
	V60_15A	V60_10A	60	2428	1692	47	36			DH3-3*02		16,9	26,3	VK1-5*03		10	16,9	21,3
Lignée B	V48_3B		48	6038	947	1	947		JH4*02	DH2-21*02		10,5	15,0				9,1	19,1
	V48_17B		48	4374	1581	3	527		JH4*02	DH2-21*02		12,5	18,6				9,4	20,0
	V48_15B		48	1977	264	1	264		JH4*02	DH3-22*01		12,8	24,8				6,4	10,0
	V54_5B		54	3518	1525	1	1525		JH4*01	DH2-15*01		13,7	21,2				10,3	19,1
	V60_6B		60	421	448	194	2		JH4*02	DH3-22*01		13,7	25,7				8,8	14,5
	V54_14B		54	4445	1465	1	1465		JH4*02	DH2-15*01		13,7	18,6				10,0	17,3
	V48_12B		48	1168	417	1	417		JH4*01	DH2-15*01		14,0	21,2				10,3	18,2
	V54_16B		54	2717	721	1	721		JH4*02	DH1-20*01		14,8	21,2				11,2	21,8
	V60_7B		60	692	239	93	3		JH5*02	DH3-22*01		15,1	25,7				8,5	13,6
	V60_1B	V60_19B	60	1686	667	6	111	VH3-30*02	JH4*02	DH3-3*01	18	15,4	23,0	VL2-14*01	JL2*01	10	10,9	20,9
	V60_19B	V60_1B	60	2609	1115	49	23		JH4*02	DH3-3*01		15,4	23,0				10,9	20,9
	V60_8B		60	2927	1447	453	3		JH4*02	DH1-20*01		16,3	25,7				12,7	24,5
	V60_11B	V60_9B	60	2655	1839	27	68		JH4*02	DH2-15*01		16,3	25,7				12,1	21,8
	V60_9B	V60_11B	60	2291	1367	238	6		JH4*02	DH2-15*01		16,3	25,7				12,1	21,8
	V60_2B		60	1430	693	6	116		JH4*02	DH2-15*01		16,6	23,0				11,5	21,8
	V60_10B		60	1108	619	17	36		JH4*02	DH2-15*01		16,6	23,9				11,5	21,8
	V60_4B		60	2196	1490	1	1490		JH4*02	DH2-15*01		16,9	26,5				12,1	21,8
	V60_13B		60	684	479	1	479		JH4*02	DH2-15*01		17,2	25,7				12,7	21,8

Figure IV-4 : Identification de deux lignées à haute spécificité pour N332. (A) Utilisation du gène variable de chaîne lourde par tous les lymphocytes B triés (gauche) et 33 lymphocytes B avec un rapport d'intensités de fluorescence pour la gp120 IAVIC22 WT / N332A supérieur à 100 (droite). (B) Caractéristique des anticorps monoclonaux des lignées A et B : temps d'isolement, intensité de fluorescence FACS pour les trois appâts gp120, rapport d'intensité de fluorescence pour la gp120 IAVIC22 WT / N332A, identification des gènes de chaînes lourdes et légères par IMGT, taux de mutations en pourcentage de nucléotides et acides aminés par rapport à la séquence de référence sur IMGT.

Les fragments PCR correspondant ont été clonés dans des vecteurs d'expression en cellules mammifères contenant les séquences codantes constantes des chaînes lourdes ou légères.

- **La lignée A identifiée comprenait 11 anticorps monoclonaux**

L'usage du gène VH1-18*01 était partagé par 19 lymphocytes B. A l'exception de deux lymphocytes B, tous utilisaient le gène JH6*02. Le gène du fragment D a été identifié comme étant DH3-3 avec une imprécision sur l'allèle qui était indiqué comme *01 ou *02. Le CDRH3 faisait 23 acides aminés. La chaîne légère identifiée pour 14 de ces lymphocytes B était VK1-5*01, JK1*01 avec un CDRL3 de 9 ou 10 acides aminés. Deux anticorps ont été trouvés en doublons, les gènes de chaînes lourdes et légères étant strictement identiques. Ces anticorps ont été isolés au même temps après infection que leurs doublons. Finalement, cette lignée nommée lignée A comprenait 11 anticorps monoclonaux avec des chaînes lourdes et légères uniques (Figure IV-4B).

- **La lignée B identifiée comprenait 16 anticorps monoclonaux**

L'usage de gène VH3-30*02 était partagé par 23 lymphocytes B mémoires, pour lesquels 18 anticorps monoclonaux ont pu être clonés (Figure IV-4B). Ils partageaient l'usage du gène JH4 avec attribution par IMGT de l'allèle *01 ou *02. Le second, plus fréquent, a été conservé comme l'allèle probable. L'attribution du gène de fragment D était très incertaine avec 5 gènes différents identifiés par IMGT. Le CDRH3 était de 18 acides aminés. La chaîne légère était de type lambda et utilisait un fragment variable LV2-14*01 avec un fragment JL2*01 et un CDRL3 de 10 acides aminés. Parmi ces anticorps, deux anticorps issus de 60 mpi étaient des doublons et deux anticorps issus de 48 et 54 mpi étaient également des doublons l'un de l'autre. Finalement, cette lignée nommée lignée B comprenait 16 anticorps monoclonaux uniques.

- **Les deux lignées d'anticorps étaient fortement mutées dès 48 mpi**

Les taux de mutation ont été calculés par rapport aux séquences de référence pour les fragments variable et jonction identifiés par la base de données IMGT. L'attribution de l'allèle du fragment V de la chaîne légère de la lignée A et du fragment J de la chaîne lourde de la lignée B n'étant pas la même pour tous les membres des lignées, les plus fréquemment identifiés ont été choisis, soit l'allèle *01 et *02 respectivement. Le fragment D des chaînes lourdes a été délibérément écarté du calcul, car son attribution ne peut être certaine à cause des nombreuses modifications qui peuvent se produire au cours de la génération du BCR du lymphocyte B naïf et de l'évolution des lignées. Ceci était bien illustré par la variété

d'attributions par IMGT du fragment D pour la chaîne lourde de la lignée B. La séquence de référence au niveau des fragments V et J peut également avoir des différences avec le BCR du lymphocyte B naïf à l'origine de la lignée, mais en l'absence d'anticorps isolés à des temps précoces, la séquence de ce dernier ne pouvait pas être inférée.

Dans les deux familles, les taux de mutations n'ont pas permis de ségréger les anticorps issus des différents temps après infection. En effet, des anticorps issus de 60 mpi étaient moins mutés que des anticorps issus de 48 ou 54 mpi. Ceci est possible si une branche de l'arbre phylogénétique de la lignée a poursuivi une évolution plus intense qu'une autre branche. Cependant, cette distribution pourrait être modifiée si l'anticorps commun non muté (UCA) est identifié, à l'aide du séquençage nouvelle génération des chaînes lourdes ou de l'isolement d'anticorps plus précoces.

- Lignée A

Les taux de mutation sur les régions V et J de la chaîne lourde de la lignée A s'échelonnaient de 15 à 16,7 % de nucléotides et 17,8 à 27,1 % d'acides aminés. L'anticorps V54-1A possédant le plus haut taux de mutations en acides aminés (27,1 %) n'avait pas la plus grande divergence en nucléotides par rapport à la séquence de référence (16,4 %) (Figure IV-4B). Les taux de mutations sur la chaîne légère s'échelonnaient de 14,8 à 16,9 % de nucléotides et 18,5 à 24,4 % d'acides aminés. Quatre anticorps dont deux issus de 48 mpi et deux issus de 60 mpi possédaient une délétion d'un codon au niveau de la jonction du fragment V et J de la chaîne légère à la fin de la CDRL3. Cette délétion n'a pas produit de décalage de phase et a résulté en la délétion de l'acide aminé 96 qui était une glutamine pour les autres anticorps de la lignée, mais qui était une proline dans la séquence de référence. La diversité de la chaîne lourde au sein de la lignée se concentrait dans le CDRH1, le début du FR3 et le CDRH3. La diversité de la chaîne légère au sein de la lignée était répartie sur toute la longueur du gène. Seules neuf positions avaient plus de deux acides aminés différents utilisés par les anticorps de la lignée ce qui signifiait qu'il s'était produit plus d'une mutation à ces positions entre 48 et 60 mpi. La diversité génétique de cette lignée entre 48 et 60 mpi semblait donc limitée. Cependant, les taux de mutations de l'ensemble des anticorps isolés étaient importants ce qui montrait une forte évolution en amont du premier temps d'isolement à 48 mpi.

- Lignée B

Les taux de mutations de la chaîne lourde de la lignée B étaient compris entre 10,2 et 17,2 % de nucléotides et 15 et 26,5 % d'acides aminés (Figure IV-4B). Les taux de mutations de la chaîne légère s'échelonnaient de 8,5 à 12,7 % de nucléotides et 10 à 24,5 % d'acides aminés. Il n'y avait pas d'insertions ou de délétions dans cette lignée. Vingt-deux positions de la chaîne lourde et neuf positions de la chaîne légère ont muté plus d'une fois entre 48 et 60 mpi. La diversité de l'échantillonnage de cette lignée était plus importante que pour la lignée A. Les anticorps les plus mutés avaient des taux similaires pour les deux lignées. Cette lignée avait également subi une forte évolution avant 48 mpi.

- **Conclusion sur l'isolement des anticorps**

Les lymphocytes B mémoires se fixant à deux appâts gp120 monomériques WT ont été triés à partir des cellules du sang périphérique à trois temps après infection entre un an et deux ans après l'apparition de la neutralisation à large spectre dans le sérum. Deux lignées d'anticorps démontrant une spécificité pour le glycane N332 sur la gp120 IAVIC22 ont été identifiées. Leurs points communs étaient un fort taux de mutation suggérant qu'ils ont évolué sur une longue période précédant l'isolement, et l'absence d'une corrélation entre le temps d'isolement et le taux de mutation. Leurs capacités à neutraliser le VIH ont ensuite été déterminées et leurs responsabilités dans l'activité du sérum ont été évaluées.

C) Activité neutralisante des anticorps

▪ Les anticorps isolés neutralisaient des virus hétérologues

Les anticorps monoclonaux des deux lignées ont été clonés dans des vecteurs d'expression pour cellules mammifères. Après expression en cellules HEK293T adhérentes, la concentration d'IgG a été titrée par ELISA dans le surnageant de culture et était typiquement entre 5 et 25 µg/mL. Ceux-ci ont été testés pour la neutralisation sur 3 points de dilution au lieu de 7 habituellement, ne donnant qu'une approximation grossière de l'IC50, corrigée pour la concentration en IgG. Le panel utilisé comprenait 12 virus hétérologues et 6 mutants N332A ainsi que 3 virus autologues de 12 mpi et 3 virus autologues de 18 mpi (données non montrées). Une fois la neutralisation hétérologue confirmée pour quelques anticorps monoclonaux des deux lignées, la totalité des anticorps a été exprimée en cellules HEK293F en suspension et purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de protéine A. La concentration a été déterminée par absorbance à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction calculé pour chaque anticorps sur ExPASy (https://web.expasy.org/protparam). Les anticorps ont ensuite été testés sur notre panel de 37 virus, de façon à être comparés à la neutralisation du sérum (Figure IV-5).

			Lignée A											Lignée B														Concordance					
Tiers	Sous-type	Virus	V48_7A	V60_5A	V60_10A	V48_8A	V48_11A	V54_1A	V48_2A	V48_9A	V60_6A	V48_13A	V60_3A	V54_5B	V60_13B	V60_4B	V48_15B	V48_3B	V60_8B	V60_11B	V60_7B	V60_10B	V54_16B	V60_2B	V48_17B	V48_12B	V60_19B	V60_6B	V54_14B	Meilleur ID50 sérum	Meilleur IC50 A	Concordance A	Meilleur IC50 B	Concordance B	Concordance globale
1A	B	SF162	0,06	0,16	0,17	0,18	0,16	0,15	0,02	0,13	0,02	0,02	0,002	1,73	0,37	0,60	1,53	0,33	1,51	1,09	1,85	0,28	0,47	0,65	0,24	0,72	0,48	0,80	0,39	15587	0,002	✓	0,24	✓	✓
2	B	MN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	29,91	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	11547	29,91	✓	NN	✘	✓
1B	B	SS1196	1,01	8,19	31,62	20,92	21,76	13,91	0,06	0,17	5,40	9,42	0,16	NN	NN	44,18	34,22	NN	28,26	9,39	28,38	12,29	31,25	10,24	NN	13,30	9,39	8,42	3,61	6613	0,16	✓	3,61	✓	✓
1B	B	DH12	0,34	14,67	29,16	10,05	29,83	12,62	0,15	0,37	0,77	0,13	0,06	51,69	6,78	4,23	19,72	2,81	17,03	8,70	16,04	7,24	1,85	13,78	1,24	7,11	2,99	3,29	1,11	6011	0,06	✓	1,11	✓	✓
2	B	TRO11	24,62	17,47	60,15	14,80	17,09	8,92	0,98	4,04	0,24	0,43	0,54	NN	22,28	26,34	46,96	18,77	35,02	14,64	34,58	8,65	5,21	19,72	8,37	11,19	6,59	8,94	1,62	5495	0,24	✓	1,62	✓	✓
1B	B	89,6	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	3608	NN	✘	NN	✘	✘
2	B	92BR020	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	40,67	12,32	6,06	4,01	11,03	3,73	10,50	8,09	2,96	6,18	5,86	6,72	2,86	11,30	3,34	0,39	2,36	3010	40,67	✓	0,39	✓	✓
1B	C	93IN905	NN	17,88	10,38	9,58	4,32	3,02	0,05	19,90	19,32	0,15	11,55	11,22	1,59	1,72	13,32	3,16	5,66	2,54	6,66	1,92	9,90	2,42	1,05	2,28	1,12	0,70	0,38	3008	0,05	✓	0,38	✓	✓
1B	B	HXB2	NN	NN	NN	NN	94,16	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	9,92	NN	NN	NN	NN	2268	94,16	✓	9,92	✓	✓
2	C	DU156	0,14	0,26	0,16	0,28	0,32	0,06	0,02	0,13	0,09	0,04	0,02	84,49	2,44	1,44	13,77	6,36	7,39	2,98	12,27	3,34	2,14	3,32	6,72	8,88	2,12	2,11	1,92	2250	0,02	✓	1,44	✓	✓
2	A	92RW020	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	96,56	17,33	1,43	1,28	0,55	0,51	0,39	0,76	1,47	1,55	0,59	0,56	1,34	0,10	2,06	0,58	0,30	0,37	1993	17,33	✓	0,10	✓	✓
3	B	ADA	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	5,82	3,46	NN	0,48	62,64	10,83	14,24	39,93	50,07	46,13	14,02	33,31	15,08	14,35	16,91	8,39	36,14	6,87	12,58	6,15	1579	0,48	✓	6,15	✓	✓
1B	B	BaL	NN	NN	NN	51,50	NN	59,09	26,85	NN	NN	7,37	88,15	3,73	1,60	0,61	0,98	0,34	0,91	0,80	1,48	1,41	0,66	0,79	0,43	1,59	0,74	0,35	0,24	1567	7,37	✓	0,24	✓	✓
3	B	JRFL	NN	12,49	1,93	15,97	3,91	8,00	0,30	62,93	18,27	0,05	33,26	58,64	42,05	8,06	61,66	4,99	24,03	6,92	50,94	4,97	10,33	8,13	2,46	9,82	6,37	14,30	2,51	1370	0,05	✓	2,46	✓	✓
2	C	CAP210	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	926	NN	✘	NN	✘	✘
2	C	IAVIC22	NN	NN	14,44	26,27	65,45	46,04	20,34	NN	NN	3,68	NN	NN	43,39	NN	NN	74,45	NN	NN	41,99	NN	NN	64,02	52,69	NN	NN	3,99	25,24	847	3,68	✓	3,99	✓	✓
3	B	PV04	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	660	NN	✘	NN	✘	✘
2	C	ZM249	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	640	NN	✘	NN	✘	✘
2	C	DU422	21,58	NN	NN	NN	NN	70,67	25,51	0,92	22,08	1,05	NN	NN	NN	15,03	NN	NN	56,72	NN	77,58	NN	91,54	NN	NN	89,39	NN	NN	605	0,92	✓	15,03	✓	✓
2	B	SC422	NN	NN	NN	NN	NN	NN	17,34	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	87,58	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	15,60	NN	NN	7,32	560	17,34	✓	7,32	✓	✓
2	A	BG505	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	57,44	NN	14,96	85,95	11,60	16,44	8,04	21,59	NN	NN	13,05	15,07	47,47	495	NN	✘	8,04	✓	✓
2	B	RHPA4	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	36,91	NN	NN	26,73	69,62	11,48	62,39	21,52	62,85	13,36	7,73	33,95	18,51	18,70	17,46	81,15	4,49	450	36,91	✓	4,49	✓	✓
2	C	DU172	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	405	NN	✘	NN	✘	✘
2	B	CAAN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	57,95	13,29	NN	344	NN	✘	13,29	✓	✓
1B	B	6535	1,27	42,02	3,83	7,85	34,94	13,79	0,44	0,79	2,83	0,92	0,39	3,03	1,77	0,73	2,34	0,49	1,12	0,81	2,49	1,17	2,21	1,33	0,63	1,07	1,32	0,32	0,63	315	0,39	✓	0,32	✓	✓
2	C	ZM135	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	267	NN	✘	NN	✘	✘
2	B	REJO67	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	85,19	NN	26,15	NN	13,22	NN	28,19	NN	NN	44,45	47,12	1,01	74,15	245	NN	✘	1,01	✓	✓
2	B	JRCSF	NN	NN	NN	NN	NN	41,95	55,22	7,23	22,11	2,04	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	22,66	66,89	NN	NN	30,44	220	2,04	✓	22,66	✓	✓
2	B	QH069	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	82,35	211	NN	✘	82,35	✓	✓
3	B	YU2	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	88,46	NN	15,34	NN	33,04	8,73	NN	10,66	41,30	13,97	NN	5,35	5,43	11,64	63,72	37,51	6,11	NN	8,39	105	15,34	✓	5,35	✓	✓
3	B	TRJO	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	52,72	NN	NN	NN	3,52	NN	NN	NN	NN	46,53	NN	8,27	21,08	NN	62,94	3,35	93	NN	✓	3,35	✓	✓
2	B	WITO	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	82	NN	✓	NN	✓	✓
2	C	ZM214	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	59	NN	✓	NN	✓	✓
2	A	KNH1144	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	80,60	NN	NN	NN	NN	NN	NN	88,69	NN	NN	NN	39,00	43	NN	✓	39,00	✓	✓
2	AE	92TH021	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	31	NN	✓	NN	✓	✓
2	A	94UG103	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	92,26	3	NN	✓	92,26	✓	✓
2	C	CAP45	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	2	NN	✓	NN	✓	✓
		Neutralisation Concordance	19%	22%	24%	27%	27%	27%	32%	32%	32%	35%	46%	30%	35%	41%	43%	43%	43%	43%	43%	43%	46%	46%	49%	49%	49%	49%	62%	81%	54%		70%		
		IC50 médian	1,01	13,58	10,38	12,43	19,42	10,77	0,71	4,93	3,15	0,92	2,04	12,32	6,06	4,23	26,97	4,36	15,99	8,39	12,74	5,76	5,86	10,24	7,49	11,25	6,24	3,64	3,61		1,48	73%	3,80	81%	84%
		Mutation HC % nt	15,8	16,7	16,7	15,5	15,3	16,4	16,7	15	15,3	16,7	15	13,7	17,2	16,9	12,8	10,5	16,3	16,3	15,1	16,6	14,8	16,6	12,5	14,0	15,4	13,7	13,7						

Figure IV-5 : Neutralisation du panel de 37 virus par les anticorps monoclonaux des lignées A et B (IC50 en µg/mL, NN : pas de neutralisation ou IC50 > 100 µg/mL) et comparaison à la neutralisation par le sérum (ID50). Les virus sont organisés par ordre décroissant d'ID50 de la meilleure neutralisation par le sérum enregistrée à 36, 48 et 54 mpi. Les anticorps sont organisés par largeur de spectre sur ce panel. La concordance entre la meilleure activité du sérum et la meilleure activité des anticorps est indiquée par ✓, la non-concordance est indiquée par ✘. Le pourcentage de concordance est indiqué en bas des trois colonnes de concordance. La concordance globale est validée si l'activité d'au moins une des lignées concorde.

Les anticorps de la lignée A neutralisaient entre 19 et 46 % des virus du panel avec des IC50 médianes entre 19,4 et 0,71 µg/mL. Les anticorps ne se sont pas ségrégés par temps d'isolement en fonction de la largeur de spectre. Le meilleur anticorps en termes de largeur de spectre était issu de 60 mpi (V60-3A) mais le second était issu de 48 mpi (V48-13A) et neutralisait plus de virus que d'autres anticorps de 60 mpi. Le seul anticorps issu de 54 mpi dans cette lignée avait une largeur de spectre modérée de 27%. Huit virus étaient neutralisés par l'essentiel des anticorps de la lignée avec des IC50 inférieures à 10 µg/mL. Il s'agissait de 6 virus de sous-type B et 2 virus de sous-type C. La plupart était de tiers 1A et 1B, mais deux étaient de tiers 2, et un était de tiers 3.

Trois anticorps, V60-3A, V60-6A et V48-9A, avaient un motif de neutralisation proche, neutralisant notamment le virus ADA alors qu'il n'était pas neutralisé par les autres anticorps de la lignée et neutralisant moins bien 93IN905 et JRFL que les autres anticorps. Ces anticorps formaient un groupe de haute similarité génétique, partageant plus de 94 % d'identité de séquence dans leurs chaînes lourdes. Ce groupe comprenait aussi l'anticorps V48-7A classé comme moins bon neutraliseur de la lignée et neutralisant 10 virus de moins que V60-3A bien qu'ils n'avaient que 9 différences en acides aminés sur les chaînes lourdes et légères. Deux anticorps également génétiquement très proches, V48-13A et V48-2A, se caractérisaient par une bonne affinité et neutralisaient efficacement BaL et IAVIC22 au contraire des autres anticorps. Une mutation synonyme dans la chaîne lourde et une mutation sur la chaîne légère P40S étaient leurs seules différences. Enfin, les six autres anticorps avaient des largeurs de spectre plus limitées.

Les anticorps de la lignée B neutralisaient entre 30 et 62 % des virus du panel de 37 virus. Les IC50 médianes étaient de l'ordre de 10 µg/mL sans évolution notable entre anticorps. Le meilleur et le moins bon anticorps en termes de largeur de spectre étaient tous deux issus de 54 mpi (V54-14B et V54-5B). Là encore, les affinités et les largeurs de spectre n'ont pas permis de ségréger les anticorps par temps d'isolement.

- **Les anticorps isolés ne récapitulaient pas l'intégralité de l'activité du sérum**

Les IC50 des anticorps isolés sont trop élevées pour récapituler les ID50 du sérum. Par exemple, un seul anticorps de la lignée B neutralise le virus HXB2 avec une IC50 de 9,92 µg/mL. Pour expliquer l'ID50 de la neutralisation de ce virus par le sérum de 1/2268, l'anticorps V48-17B aurait dû être présent dans le sérum à une concentration d'environ 22 mg/mL. Une telle concentration sérique d'un anticorps monoclonal est impossible puisque la concentration totale d'IgG dans le sérum est d'environ 10 mg/mL. Pour ce virus et tous les autres virus de ce panel, nous pouvons conclure que la neutralisation par le sérum n'était pas récapitulée par les anticorps isolés.

En revanche, en considérant un seuil de positivité de la neutralisation par les anticorps à 100 µg/mL et un seuil de positivité de la neutralisation par le sérum à une ID50 de 1/100, nous avons comparé les spectres de neutralisation par les lignées A et B et le sérum.

La compilation de l'activité des anticorps de la lignée A permettait d'atteindre 54 % de neutralisation sur le panel de 37 virus et était en concordance avec la neutralisation du sérum pour près des trois quart des virus du panel. En revanche, 10 virus du panel neutralisés par le sérum ne l'étaient par aucun anticorps de la lignée A. La compilation des anticorps de la lignée B permettait d'atteindre 70% de neutralisation. Plus de la moitié des virus étaient neutralisés à des IC50 inférieures à 10 µg/mL dont quatre virus de tiers 3. Sept virus étaient neutralisés par le sérum et par aucun anticorps de la lignée B. La neutralisation par les anticorps de la lignée B concordait avec la neutralisation par le sérum pour 80% de virus.

Ensemble, les deux lignées concordaient avec la neutralisation du sérum pour 84% de virus du panel. Les virus neutralisés par le sérum et neutralisés par aucun anticorps des deux lignées étaient au nombre de 6 (89,6, CAP210, PV04, ZM249, DU172, ZM135). En conclusion, tous les anticorps isolés n'ont pas suffi à expliquer l'intégralité de l'activité neutralisante hétérologue du sérum.

- **La neutralisation sur un large panel était modérément large spectre**

Le panel de 37 virus peut mal représenter la neutralisation des souches circulantes dans le monde, car le sous-type B est surreprésenté, certains sous-types sont absents et certaines souches sont très sensibles à la neutralisation. La neutralisation du panel de Seaman *(Seaman, J Virol, 2010)* de 101 virus par 3 anticorps de chaque lignée a donné une indication plus correcte sur la largeur de spectre (Figure IV-6).

Code	Sous-type	Virus	V48-8A	V60-3A	V48-13A	V60-4B	V60-6B	V54-14B
NIH-001	B	6535,3	NN	16,39	3,61	1,94	0,53	0,75
NIH-003	B	SC422661.8	NN	NN	NN	NN	NN	4,55
NIH-004	B	PVO.4	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-005	B	TRO.11	4,38	0,28	0,10	10,55	4,76	0,65
NIH-006	B	AC10.0.29	NN	55,90	NN	19,14	NN	0,94
NIH-007	B	CAAN5342.A2	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-008	B	WEAU.d15.410.787	NN	NN	NT	NN	NN	NN
NIH-009	B	1006.11.C3.1601	NN	NN	NN	NN	0,14	1,29
NIH-010	B	1054.07.TC4.1499	NN	NN	NN	NN	14,97	36,49
NIH-011	B	1056.10.TA11.1826	NN	NN	NN	NN	NN	11,44
NIH-012	B	1012.11.TC21.3257	25,83	46,83	0,16	NN	6,02	2,00
NIH-013	B	6240.08.TA5.4622	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-014	B	6244.13.B5.4567	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-015	B	62357.14.D3.4589	NN	NN	NN	8,73	7,48	1,46
NIH-016	B	SC05.8C11.2344	NN	NN	NN	5,74	2,01	3,24
NIH-017	C	Du156.12	0,21	0,10	0,06	2,32	5,24	3,32
NIH-018	C	Du172.17	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-019	C	Du422.1	NN	0,40	9,73	9,24	NN	NN
NIH-020	C	ZM197M.PB7	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-021	C	ZM214M.PL15	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-022	C	ZM233M.PB6	77,46	1,49	62,81	NN	NN	NN
NIH-023	C	ZM249M.PL1	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-024	C	ZM53M.PB12	NN	NN	NN	58,71	0,09	1,76
NIH-025	C	ZM109F.PB4	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-026	C	ZM135M.PL10a	NN	57,02	NN	NN	NN	NN
NIH-027	C	CAP45.2.00.G3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-028	C	CAP210.2.00.E8	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-029	C	HIV-001428.2.42	24,22	1,02	26,05	NN	NN	NN
NIH-030	C	HIV-0013095.2.11	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-031	C	HIV-16055.2.3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-034	C	Ce0393 C3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-035	C	Ce1176 A3	1,45	5,88	0,94	NN	19,86	2,22
NIH-036	C	Ce2010 F5	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-038	C	Ce1172 H1	0,49	97,52	0,09	5,01	NN	3,25
NIH-039	C	Ce2060 G9	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-040	C	Ce703010054 2A2	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-041	C	BF1266.431a	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-042	C	ZM246F.D5	NN	NN	NN	NN	NN	0,83
NIH-043	C	ZM249M.B10	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-044	C	ZM247F.F7	51,44	7,63	8,07	NN	NN	NN
NIH-045	C	7030102001E5(Rev.)	0,20	0,95	0,05	0,55	1,30	0,24
NIH-046	C	1394C9G1(Rev.)	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-047	C	Ce704809221 1B3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-048	BC	CNE19	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-049	BC	CNE20	8,38	0,36	0,39	NN	NN	NN
NIH-050	BC	CNE21	NN	20,05	NN	NN	NN	14,79
NIH-051	BC	CNE17	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-052	BC	CNE30	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-053	BC	CNE52	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-054	BC	CNE53	0,04	0,76	0,02	3,13	3,70	1,03
NIH-055	BC	CNE58	NN	NN	NN	NN	NN	17,92
NIH-056	A	Q168ENVa2	NN	NN	NN	NN	1,03	0,35
NIH-057	A	MS208.A1	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-058	A	Q23ENV17	34,10	2,29	1,09	1,25	1,53	0,93
NIH-060	A	Q769ENVd22	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-061	A	Q259ENVd2.17	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-063	A	0330.v4.c3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-064	A	0260.v5.c1	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-065	A	191955 A11	77,96	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-066	A	191084 B7.19	NN	NN	NN	5,98	1,79	1,83

Code	Sous-type	Virus	V48-8A	V60-3A	V48-13A	V60-4B	V60-6B	V54-14B
NIH-068	AE	620345.c01	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-069	AE	C1080.c03	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-070	AE	R2184.c04	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-072	AE	R3265.c06	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-073	AE	C3347.c11	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-074	AE	C4118.c09	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-075	AE	CNE8	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-076	AE	CNE5	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-077	AE	BJOX009000.02.4	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-078	AE	BJOX015000.11.5	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-079	AE	BJOX010000.06.2	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-080	AE	BJOX025000.01.1	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-081	AE	BJOX028000.10.3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-082	G	X1193 c1	NN	2,26	NN	NN	NN	NN
NIH-083	G	P0402 c2 11	7,46	NN	0,50	NN	NN	NN
NIH-084	G	X1254 c3	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-085	G	X2088 c9	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-086	G	X2131 C1 B5	NN	1,66	NN	NN	NN	NN
NIH-087	G	P1981 C5 3	2,15	1,38	0,29	NN	1,91	NN
NIH-088	G	X1632 S2 B10	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-089	D	3016.v5.c45	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-090	D	A07412M1.vrc12	NN	NN	5,62	NN	NN	NN
NIH-091	D	231965.c01	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-094	CD	3817.v2.c59	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-095	CD	6480.v4.c25	1,71	1,28	2,60	NN	13,53	38,31
NIH-096	CD	6952.v1.c20	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-097	CD	6811.v7.c18	7,86	NN	0,11	1,18	0,32	0,42
NIH-098	CD	89.F1 2 25	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-099	AC	3301.v1.c24	2,46	NN	0,28	NN	30,84	NN
NIH-100	AC	6041.v3.c23	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-101	AC	6540.v4.c1	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-102	AC	6545.v4.c1	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-103	ACD	0815.v3.c3	NN	NN	NN	NN	58,84	10,44
NIH-104	ACD	3103.v3.c10	10,87	0,07	0,57	NN	NN	1,93
NIH-107	AG	T251.18	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-108	AG	T235.47	NN	89,30	60,00	NN	NN	NN
NIH-114	AG	T257.31	NN	NN	NN	10,11	NN	NN
NIH-115	AG	928,28	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-116	AG	T263.8	NN	NN	NN	NN	NN	18,22
NIH-118	AG	T255.34	NN	NN	NN	NN	NN	NN
NIH-119	AG	T211.9	NN	NN	NN	NN	NN	NN
IC50 médian (µg/mL)			8,38	2,29	0,66	5,74	2,01	1,80
Pourcentage de neutralisation par sous-type								
Sous-type	A	9	22%	11%	11%	11%	33%	33%
	AC	4	25%	0%	25%	0%	25%	0%
	ACD	2	50%	50%	50%	0%	50%	100%
	AE	13	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	AG	7	0%	14%	14%	14%	0%	14%
	B	15	13%	27%	27%	33%	47%	67%
	BC	8	25%	38%	25%	13%	13%	38%
	C	28	25%	32%	29%	18%	14%	21%
	CD	5	40%	20%	40%	20%	40%	40%
	D	3	0%	0%	33%	0%	0%	0%
	G	7	29%	43%	29%	0%	14%	0%
Neutralisation de 101 virus			19%	23%	23%	14%	20%	27%
Neutralisation de 37 virus			27%	46%	35%	41%	49%	62%

Figure IV-6 : Neutralisation du panel de Seaman de 101 virus par trois anticorps de la lignée A et trois anticorps de la lignée B et pourcentage de neutralisation pour chaque sous-type. Le pourcentage de neutralisation sur le panel de 37 virus est indiqué pour rappel.

Les deux meilleurs anticorps de la lignée A identifiés sur le panel de 37 virus neutralisaient tous deux 23 % du panel de Seaman ce qui était environ deux fois plus faible que la largeur de spectre sur 37 virus. L'anticorps V48-8A avait une largeur de spectre plus faible à 19 %. Le panel de Seaman comprend 3 virus de sous-type D, le même sous-type infectant le donneur. Seul V48-13A neutralisait un des 3 virus de ce sous-type. Les anticorps de cette lignée ne neutralisaient aucun virus de sous-type AE, la majorité étant dépourvue d'un glycane N332 au profit d'un glycane en position N334. Aucun autre sous-type n'était

résistant à la neutralisation par l'anticorps V48-13A qui est apparu comme le meilleur anticorps de la lignée. Cet anticorps avait aussi des IC50 plus faibles.

L'anticorps de la lignée B ayant la plus grande largeur de spectre était l'anticorps identifié comme le meilleur sur le panel de 37 virus, V54-14B. Il neutralisait 27 % des virus, mais ne neutralisait aucun virus de sous-type AC et G contrairement au deuxième meilleur anticorps V60-6B. Ces anticorps ne neutralisaient aucun virus de sous-type D. Le taux de recouvrement de la neutralisation par le meilleur anticorps de la lignée A et le meilleur anticorps de la lignée B était de 74 %, avec 12 % de virus neutralisés par les deux anticorps et 63 % de virus neutralisés par aucun des deux anticorps. Dans la plupart des cas, les IC50 étaient plus faibles pour V54-14B sur les virus neutralisés par V48-13A.

La largeur de spectre des anticorps de ces deux lignées apparaissait très modérée par rapport à d'autres anticorps isolés contre cette région, et les IC50 étaient également plus élevées, environ 100 fois plus que l'anticorps PGT128.

- **Les virus dont les appâts de tri cellulaire étaient issus étaient mal neutralisés**

Les gp120 recombinantes monomériques IAVIC22 et 92BR020 ont été utilisées pour le tri des lymphocytes B. Tous les lymphocytes liant ces deux gp120 WT par leur BCR ont été triés. Cependant, il est apparu que le pseudovirus d'IAVIC22 était mal neutralisé par les anticorps des deux lignées. Chaque lignée ne présentait qu'un seul anticorps neutralisant IAVIC22 WT avec une IC50 inférieure à 10 µg/mL. Par ailleurs, le virus 92BR020 était correctement neutralisé par les anticorps de la lignée B, mais pas par les anticorps de la lignée A.

Pour comprendre si cette absence de neutralisation était due à une préférence pour la gp120 monomérique, nous avons vérifié par ELISA la fixation de quatre anticorps de chaque lignée aux gp120 monomériques (Figure IV-7). Les anticorps se liaient aux gp120 monomériques, conformément aux intensités de fluorescence du tri par FACS. De plus, la mutation N332A sur la gp120 IAVIC22 abolissait la fixation de tous les anticorps.

Les trimères à la surface des pseudovirus se présentaient donc d'une manière qui n'était pas aussi bien reconnue par les anticorps des deux lignées que la forme gp120 monomérique. Cela peut être dû à un encombrement stérique du site de fixation des anticorps par les protomères adjacents. La composition en glycane des pseudovirus produits en cellules HEK293T par rapport à la construction monomérique produite en HEK293F pourrait également être en cause. Un test de fixation de gp120 monomériques extraites par lyse de pseudovirus nous affranchirait d'une éventuelle différence de contenu en glycane. Si la préférence pour la forme monomérique est vérifiée pour un plus grand nombre de virus, on pourra en conclure que la sélection des anticorps s'est probablement d'abord faite sur

des gp120 monomériques, et que certains anticorps se sont adaptés à la reconnaissance de la protéine d'enveloppe trimérique. Cette adaptation ne semble d'ailleurs pas aboutie puisqu'en l'état de nos connaissances, la forme trimérique d'un ou deux virus n'est pas encore reconnue par les anticorps de ces lignées.

			Tri cellulaire FACS					ELISA				Neutralisation			
			Liaison gp120 Intensité de fluorescence				ratio	Liaison gp120 EC50 (µg/mL)			ratio	Neutralisation trimère IC50 µg/mL			ratio
		mpi	IgG	92BR020 gp120 WT	IAVIC22 gp120 WT	IAVIC22 gp120 N332A	IAVIC22 WT vs N332A	92BR020 WT	IAVIC22 WT	IAVIC22 N332A	IAVIC22 WT vs N332A	92BR020 WT	IAVIC22 WT	IAVIC22 N332A	IAVIC22 WT vs N332A
Lignée A	3A	60	488	3802	1075	1	1075	0,02	0,02	NB	>4991	40,67	NN	NN	NN
	6A	60	685	4698	2400	62	39	0,06	0,03	NB	>3708	NN	NN	NN	NN
	10A	60	1262	5298	3474	8	434	26,89	3,02	NB	>33	NN	14,44	NN	>7
	11A	48	1411	4295	1666	1	1666	27,50	4,38	NB	>23	NN	65,45	NN	>2
Lignée B	2B	60	5053	1430	693	6	116	0,45	6,38	NB	>16	6,72	64,02	NN	>2
	5B	54	16342	3518	1525	1	1525	0,64	24,01	NB	>4	12,32	NN	NN	NN
	8B	60	13011	2927	1447	453	3	0,54	3,75	NB	>27	10,50	NN	5,01	<0,05
	12B	48	3197	1168	417	1	417	0,21	2,79	NB	>36	11,30	NN	NN	NN
				Liaison	Liaison	Pas de liaison	Spécificité N332	Liaison	Liaison	Pas de liaison	Spécificité N332	Neutralisation faible Lignée A	Neutralisation faible Lignée A et B	Spécificité N332 ne peut pas être déterminée	

Figure IV-7 : Liaison aux gp120 utilisées pour le tri cellulaire mesurée par ELISA de quatre anticorps de chaque lignée. La concentration d'anticorps nécessaire pour atteindre la moitié du signal (EC50) est exprimée en µg/mL. NB : Pas de liaison détectée. Les intensités de fluorescence du tri cellulaire représentant la liaison aux appâts gp120 sont indiquées. La neutralisation des pseudovirus WT et du mutant N332A d'IAVIC22 est indiquée.

- **La neutralisation des virus autologues suggérait l'ancienneté de l'induction des lignées**

Plus de 200 séquences de protéines d'enveloppe autologues ont été produite par Monogram Biosciences à partir des échantillons de 11 temps après infection entre 12 et 78 mpi. Plus de 50 clones ont été sélectionnés pour leur diversité génétique pour clonage dans un vecteur d'expression. Les pseudovirus exprimant les protéines d'enveloppe autologues ont été produits et testés pour la neutralisation par certains anticorps isolés (Figure IV-8).

Les anticorps de la lignée A neutralisaient efficacement tous les clones issus de 12 mpi. A 18 mpi, des mutants d'échappement apparaissaient et échappaient à la neutralisation de tous ou certains anticorps de la lignée. L'IC50 médiane était diminuée d'un facteur 10 environ. A 24 mpi, seul un anticorps, V48-9A, neutralisait encore tous les variants. A 30 mpi, l'échappement viral était total.

Pour la lignée B, le motif de neutralisation autologue était très différent. Les protéines d'enveloppe autologues de 12 mpi n'étaient pas ou peu neutralisées, à l'exception notable du clone V12-27. La neutralisation autologue apparaissait à 18 mpi avec des IC50 modérées et plus faibles que ceux de la lignée A. La neutralisation autologue se maintenait jusqu'à 36 mpi ou deux variants sur quatre testés étaient résistants à la neutralisation. A 42 et 48 mpi, la neutralisation semblait éparse mais le faible nombre de clones testés ne permettait pas d'appréhender l'étendue de l'échappement. En revanche, à partir de 54 mpi,

la neutralisation autologue était quasiment nulle, et marquait donc l'échappement viral total.

La lignée A a probablement été induite par une protéine d'enveloppe autologue apparue très précocement avant 12 mpi. En revanche, la lignée B a été induite plus tardivement, probablement par une protéine d'enveloppe proche du clone V12-27 apparue aux alentours de 12 mpi.

		Lignée A								Lignée B						
		V48-7A	V60-10A	V48-8A	V48-11A	V54-1A	V48-2A	V48-9A	V60-3A	V54-5B	V60-4B	V48-3B	V60-8B	V60-11B	V60-2B	V48-12B
12 mpi	V12-007	0,07	0,11	0,05	0,03	0,03	0,03	0,09	0,06	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V12-011	0,47	0,42	0,12	0,14	0,03	0,06	0,51	0,23	NN	NN	NN	NN	NN	NN	48,69
	V12-027	1,18	0,18	0,24	0,17	0,10	0,07	0,57	0,29	NN	3,07	NN	58,49	7,64	8,20	10,46
	V12-043	0,12	0,12	0,07	0,05	0,03	0,02	0,12	0,05	NN	NN	NN	NN	NN	NN	16,24
	V12-047	2,44	0,32	0,05	0,03	0,02	0,01	0,60	1,02	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V12-049	0,05	0,11	0,04	0,02	0,03	0,02	0,06	0,04	NN	NN	NN	NN	NN	NN	10,26
	V12-056	0,05	0,11	0,03	0,02	0,02	0,02	0,05	0,03	NN	NN	NN	NN	NN	NN	34,72
	V12-062	0,14	2,79	0,15	0,18	0,05	0,03	0,12	0,06	NN	NN	NN	NN	NN	Nn	NN
	V12-067	1,18	0,87	0,25	0,22	0,09	0,09	0,71	0,30	NN	7,68	NN	NN	11,61	19,14	17,71
	V12-080	0,07	0,18	0,04	0,02	0,02	0,02	0,07	0,04	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V12-088	0,38	0,13	0,08	0,04	0,08	0,02	0,10	0,11	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
18 mpi	V18-017	0,82	6,76	NN	NN	NN	10,76	0,40	1,06	10,63	2,43	3,64	6,96	5,40	0,56	12,09
	V18-032	0,20	9,29	NN	NN	46,02	4,18	0,39	0,56	7,69	1,87	2,18	8,44	3,42	0,62	8,47
	V18-046	0,47	34,76	18,12	NN	47,42	2,20	0,30	0,56	5,70	2,96	1,60	10,40	5,63	NN	8,42
	V18-049	0,21	0,92	2,43	1,58	1,62	0,20	0,12	0,60	3,28	1,90	0,76	2,98	1,61	41,70	5,80
	V18-077	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	0,50	33,89	0,52	0,56	NN	6,64
	V18-095	1,52	NN	NN	NN	NN	NN	0,51	0,60	14,48	3,18	2,40	9,30	3,05	NN	6,94
24 mpi	V24-025	1,70	NN	NN	NN	NN	NN	0,28	0,64	2,90	0,87	0,41	2,56	1,53	NN	3,19
	V24-043	NN	0,22	0,10	0,07	0,04	0,05	13,29	NN	3,16	1,71	0,70	5,94	1,92	NN	4,70
	V24-050	1,46	NN	NN	NN	NN	35,71	0,80	0,20	13,11	3,56	2,66	11,70	3,85	NN	6,94
	V24-059	NN	0,34	0,21	0,13	0,07	0,10	19,78	NN	4,35	2,97	1,52	11,82	4,63	NN	10,07
	V24-069	0,42	43,32	NN	76,99	21,43	5,08	0,20	0,59	5,94	2,10	1,49	4,48	1,87	3,86	2,54
	V24-081	1,84	NN	NN	NN	NN	NN	0,47	1,47	5,36	1,88	1,37	5,27	1,73	4,55	5,89
	V24-087	1,40	NN	NN	NN	NN	42,99	0,47	0,56	2,15	2,33	0,36	4,28	1,92	2,19	2,57
	V24-093	0,98	NN	NN	NN	NN	38,31	0,28	0,62	2,36	2,39	0,49	4,06	1,72	2,52	2,74
30 mpi	V30-003	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	7,45	5,38	1,47	13,42	6,06	7,92	9,38
	V30-030	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	41,70	50,97	2,29	2,84	9,23	3,40	2,70	6,45
	V30-064	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	2,48	1,10	0,40	4,13	1,79	2,19	2,90
	V30-089	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	1,47	0,62	0,21	2,82	1,04	1,46	2,29
	V30-091	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	38,28	0,37	1,69	0,60	0,89	0,98	1,91
	V30-092	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	1,88	1,03	0,30	3,91	1,82	0,35	3,96
	V30-119	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	0,14	0,44	0,08	0,67	0,66	0,83	0,94
	V36-033	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	3,86	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V36-076	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	1,50	1,04	0,39	3,21	1,71	2,23	2,52
	V36-102	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	3,16	1,42	0,66	6,93	2,24	3,72	5,17
	V36-152	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
42 mpi	V42-117	NN				NN			NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V42-143									12,16	NN	3,23	NN	NN	NN	6,91
48 mpi	V48-028	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	1,71	NN	84,28	2,41	14,53	NN
	V48-55									NN	1,44	NN	8,20	1,44	10,27	NN
54 mpi	V54-25									NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V54-33									NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V54-93									NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
60 mpi	V60-37	NN				NN			NN	NN	74,90	NN	NN	28,44	51,25	NN
	V60-142	NN				NN			NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
66 mpi	V66-29	NN				NN			NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V66-45									NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
78 mpi	V78-40	NN				NN			NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN
	V78-58									NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN

Figure IV-8 : Neutralisation par les anticorps des lignées A et B de pseudovirus exprimant la protéine d'enveloppe des virus autologues issus de 12 à 78 mpi. Les anticorps sont organisés par pourcentage de neutralisation sur le panel de 37 virus.

D) Cartographie de l'épitope

- **Les anticorps isolés ciblaient la région du patch riche en mannose**

Les anticorps clonés ont été choisis pour leur différentiel de liaison à la gp120 IAVIC22 WT par rapport à la gp120 muté N332A. Les anticorps devaient donc être spécifiques de la région N332 de façon cohérente avec la cartographie de la réponse neutralisante dans le sérum. Afin de vérifier et de caractériser l'épitope ciblé par ces anticorps, nous avons réalisé une cartographie avec des mutants de la région N332 sur des virus hétérologues et autologues. Au total, 14 simples mutants et 5 doubles mutants avec N332A ont été testés et portaient sur 12 virus hétérologues (Figure IV-9A). De plus, une cartographie a pu être réalisée de manière systématique en utilisant la librairie de simple mutation en alanine du virus JRCSF (Figure IV-9B). Malheureusement, ce virus était mal neutralisé par les anticorps des deux lignées. Seul l'anticorps V60-3A, un des meilleurs de la lignée A, neutralisait JRCSF avec une affinité suffisante pour permettre d'observer l'impact des mutations. Des virus autologues de 12, 18, 24 et 30 mpi ont été choisis pour la cartographie (Figure IV-9C). Le virus V12-27 a été choisi car il était le mieux neutralisé par la lignée B à ce temps. Les virus V18-49 et V24-69 n'étaient pas des variants d'échappement pour les anticorps des deux lignées. En revanche, le virus V30-119 était neutralisé par la lignée B, mais pas par la lignée A, car l'échappement viral s'était déjà produit à 30 mpi.

Figure IV-9 : Cartographie de l'épitope par comparaison de la neutralisation de virus hétérologues et autologues WT par rapport à des virus portant des mutations de la gp120. Les résultats sont exprimés en rapport des IC50 pour le virus mutant / virus WT. (A) Effet de simples et doubles mutations de la gp120 sur la neutralisation de 12 virus hétérologues par les anticorps des lignées A et B. Les anticorps sont organisés par pourcentage de neutralisation du panel de 37 virus. (B) Effet de simples mutations en alanine sur la neutralisation du virus hétérologues JRCSF par l'anticorps V60-3A. (C) Cartographie de l'épitope par comparaison de la neutralisation de virus autologues WT par rapport à des virus autologues portant des mutations de la gp120.

A

		Lignée A											Lignée B															
		V48-7A	V60-5A	V60-10A	V48-8A	V48-11A	V54-1A	V48-2A	V48-9A	V60-6A	V48-13A	V60-3A	V54-5B	V60-13B	V60-4B	V48-15B	V48-3B	V60-8B	V60-11B	V60-7B	V60-10B	V54-16B	V60-2B	V48-17B	V48-12B	V60-1B	V60-6B	V54-14B
Neutralisation sur 37 virus		19%	22%	24%	27%	27%	27%	32%	32%	32%	35%	46%	30%	35%	41%	43%	43%	43%	43%	43%	43%	46%	46%	49%	49%	49%	49%	62%
Env	Mutation	Rapport IC50 Mut/WT											Rapport IC50 Mut/WT															
JRFL	N156A	>0,52	>6,3	>79	>18	>13	>5,7	169	>3,44	>6,3	>138	>1,87	0,66	0,52	1,14	0,99	1,06	1,27	1,66	0,44	1,25	1,25	1,10	0,93	2,55	1,17	2,19	1,71
JRFL	N160A	>0,52	0,95	0,48	0,44	0,10	0,24	0,96	1,31	1,51	1,11	1,04	0,58	0,50	0,77	0,74	0,43	0,85	0,73	0,62	0,74	0,82	0,65	0,75	0,95	0,77	1,56	0,83
JRFL	Q170A	>0,52	1,57	0,74	3,44	0,41	0,93	2,95	2,75	3,00	2,42	2,33	1,73	1,26	1,49	1,57	1,76	1,80	1,52	2,55	1,41	1,63	1,40	1,62	2,22	1,78	2,60	1,73
JRFL	K236T	>0,52	0,80	0,39	1,46	0,09	0,25	1,06	1,43	0,74	0,58	0,95	0,70	0,60	0,90	0,95	0,86	1,01	0,82	0,96	0,78	0,91	0,73	0,70	1,05	0,98	1,43	0,88
JRFL	N241S	>0,52	2,15	0,46	10,1	0,12	0,87	2,85	2,31	1,30	1,03	1,40	0,92	0,75	1,01	1,22	1,42	1,16	0,91	0,97	0,86	1,18	0,84	1,01	1,18	0,99	1,85	0,97
JRFL	N279A	0,63	0,16	0,23	0,20	0,04	0,10	0,66	0,99	0,20	0,32	0,66	0,60	0,66	0,49	1,14	0,70	0,93	0,63	1,26	0,73	0,82	0,21	0,56	0,86	0,63	1,14	0,87
92BR020	N295A												0,72	0,43	0,48	1,10	0,40	0,66	0,60	2,75	0,70	0,50	0,43	0,28	0,59	0,78	4,24	0,80
JRCSF	N295A						NN	0,58			0,80	1,07	NN	NN	NN	NN	NN			NN	NN		NN	>4,41		NN		
JRFL	N295A	NN		>52	>6,3	>26	>12,5	135	>1,59	>5,5	704	>3,01	NN	>2,38	>12,4	>1,62	>20	>4,16	>14,4	>1,96	>20	>8,7	>12,3	>41	>10,2	>15,7	>7,1	
SF162	N295A	3,80	18,9	5,8	6,2	21	13,2	58				3,02	14,0	3,94	2,11	1,53	13,9	9,5	2,55	5,7	3,21	9,1	4,07	8,9	3,68	2,71	6,7	13,2
93IN905	T297A	>1,69	>5,3	>41	6,6	13,5	>381	>2387	>36	>7,1	>22	>21	15,2	0,64	11,4	>14,9	18,7	74	50	18,9	186	70	45	7,7	4,13	6,9	21	10,6
JRFL	N300H	NN					>43				286	>2,29	>2,64											>26		>18,4	>6,6	>54
92BR020	N301A												4,14	0,59	0,92	1,59	0,74	1,19	0,90	3,88	0,89	1,16	1,07	0,55	0,85	2,55	12,6	0,67
JRFL	N301A	>0,52	7,3	72	>18	>13	>5,7	167	5,4	3,87	136	2,60	>1,66	>2,14	>11,3	>2,38	10,8	>9,8	>19	7,7	8,1	>8,7	2,75	>22	>30	>12,3	>7,1	>39
JRFL	D325N	<0,42					0,18				0,30	0,44	>2,64											>26		>18,4	>6,6	>54
92BR020	N332A	NN		NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	NN	>2,46	2,20	2,02	2,68	0,23	0,66	0,31	1,41	0,42	0,72	1,30	0,69	7,5	0,78	0,76	3,40	
92RW020	N332A												7,7	1,74	2,14	0,53	1,36	0,19	3,62	0,52	0,85	0,32	2,75	3,46	0,69	0,56	0,83	0,72
ADA	N332A						NN	NN			NN	>207	NN	>9,2	>7,02	>2,5	>1,997	>6,5	>5,7	0,95	>6,8	>4	>5,9	>11,9	>24	>14,6	>7	>9
BaL	N332A						>1,69	>3,72			>13,6	>1,13	0,67	1,14	1,67	0,37	0,61	0,88	15,6	0,24	0,56	0,71	1,05	1,70	3,73	0,77	0,66	89
DH12	N332A	>298		>3,43	>9,9	>3,35	>7,9	>674	>273	>130	>747	>1939	NN	4,50	4,07	>5,1	>36	2,99	1,39	>6,2	5,8	10,5	1,82	>81	>14,1	>33	1,16	
DU156	N332A	>1799	>474	>3612	>1921	>1820	>1243	>2651	>2565	>2375	>2051	>1799	>2	10,4	1,23	>7,5	>22	0,61	1,36	3,31	1,12	6,1	1,20	>16,6	>30	1,10	5,1	>52
IAVIC22	N332A	NN		>6,9	>3,81	>1,53	>2,17	>4,92	NN	NN	>27	NN	NN	>2,3	NN	NN	NN	<0,05	NN	0,04	NN			>1,56	>1,9	NN	NN	0,02	
JRCSF	N332A						NN	>2,38			>4,52	>49	NN	NN	NN	NN	NN			NN	NN		NN	>4,41		NN		
JRFL	N332A	>0,52	>6,3	>79	>18	>13	>5,7	>442	>3,44	>6,3	>138	>1,87	>1,66	>2,14	>11,3	1,85	21	6,7	93	0,55	>22	>8,7	>9,1	>22	>30	>12,3	4,58	>39
SF162	N332A	>4746	>384	>1730	>1582	>1286	>841	>5034				>6591	>53	2,49	1,01	1,37	132	1,95	1,90	1,19	1,76	1,49	0,91	135	61	0,83	0,73	82
TRO11	N332A	>4,06		>1,66	>6,8	>5,9	>11,2	>102	>25	>411	>232	>186	<0,04	0,32	0,07	0,04	0,05	0,09	0,34	0,03	0,42	0,06	0,16	0,32	0,53	0,52	0,04	
92BR020	N386A												0,27	0,30	0,28	0,76	0,22	0,63	0,55	2,15	0,50	0,42	0,29	0,25	0,45	0,59	2,47	0,41
IAVIC22	N386A										1,84																0,98	
92BR020	N392A												0,48	0,32	0,33	0,76	0,32	0,80	0,64	2,50	0,61	0,31	0,57	0,30	0,46	0,48	4,68	0,40
93IN905	N392A	1,25	>5,3	>41	6,2	6,8	>381	1013	5,4	1,40	>22	0,95	1,48	1,15	0,73	1,81	1,96	2,27	11,6	1,34	37	1,99	1,72	0,58	0,35	0,61	4,38	1,12
IAVIC22	N392A										1,06																0,54	
92RW020	N332A-N295A												236	11,9	66	20,0	67	3,54	6,7	1,13	9,9	22	3,91	315	34	58	1,67	29
JRFL	N332A-N295A	NN		>52	>6,3	>26	>12,5	>338	>1,59	>5,5	>1853	>3,01	NN	>2,38	>12,4	>1,62	>20	>4,16	>14,4	>1,96	>20	>8,7	>12,3	>41	>10,2	>15,7	>7,1	
92BR020	N332A-N301A	NN		NN	NN	NN			NN	NN			8,3	18,0	74	7,1	7,9	2,12	>12,4	7,3	22	13,0	25	48	>8,8	24	17,3	>29
BaL	N332A-N301A												>20	>46	>172	>73	>206	>62	>43	>98	>100	>43	>69	>173	>54	>94	>71	>116
JRFL	N332A-N301A	>0,52	>6,3	>79	>18	>13	>12,5	>338	>3,44	>6,3	>1853	>1,87	NN	>2,38	>12,4	0,42	2,90	>9,8	>19	0,10	>20	>8,7	3,60	>41	>30	>15,7	>7,1	>39
92RW020	N332A-N339A												5,5	14,0	4,59	0,25	40	0,50	2,38	0,75	1,25	0,78	2,22	6,3	0,86	0,69	0,43	1,01
JRFL	N332A-N339A	>0,52	>6,3	>79	>18	>13	>5,7	>442	>3,44	>6,3	>138	>1,87	>1,66	>2,14	>11,3	1,82	14,7	2,59	88	0,29	>22	>8,7	>9,1	>22	>30	>12,3	2,19	>39
SF162	N332A-N339A	>4746	>384	>1730	>1582	>1286	>841	>5034				>6591	>53	2,37	1,36	1,82	60	1,32	2,22	1,58	1,79	1,19	1,29	296	36	0,88	1,04	116
92BR020	N332A-N386A												2,74	1,64	1,04	0,51	1,41	0,14	0,83	2,65	1,06	0,14	0,91	14,2	1,22	1,14	2,90	1,33
IAVIC22	N332A-N386A										>12,1																0,01	
92BR020	N332A-N392A	NN		NN	NN	NN			NN	NN			>8,3	9,1	11,1	2,45	2,31	0,26	0,92	2,18	5,3	0,84	3,21	15,7	0,62	11,1	3,27	2,32
92RW020	N332A-N392A												1,45	10,4	1,30	0,91	6,0	0,22	0,89	0,54	5,5	0,98	1,52	5,5	1,02	0,39	1,44	0,50
IAVIC22	N332A-N392A	NN		>6,9	>3,81	>1,53			NN	NN	>12,1							<0,03	NN						NN		0,01	
SF162	N332A-N392A	>4746	>384	>1730	>1582	>1286	>841	>5034				>6591	>53	2,62	1,13	2,22	72	2,23	2,23	1,74	1,12	3,80	0,54	187	304	0,67	2,95	39

B

V60-3A Rapport IC50 JRCSF Mutant / WT					
N78A	0,95	K207A	0,87	S334A	>16
N80A	1,17	F210A	1,31	Q337A	0,69
Q82A	0,75	I213A	0,23	N339A	0,40
E83A	0,68	K236T	0,63	T341A	0,54
E87A	0,85	N241A	0,85	K343A	0,55
N88A	0,87	R252A	1,24	R350A	0,76
T90A	0,90	S256A	0,94	N355A	0,70
M95A	1,10	T257A	0,72	N356A	1,22
K97A	0,87	N262A	7,31	I359L	0,68
E102A	1,04	R273A	1,24	S365A	1,52
W112A	2,07	N276A	0,65	P369A	0,86
D113A	1,22	D279A	0,30	V372A	0,79
V120A	0,94	N280A	0,20	M373A	0,84
K121A	1,47	K282A	0,35	Y384A	1,05
L122A	9,20	T283A	0,39	N386A	0,49
T123A	0,54	N289A	0,77	S387A	0,43
L125A	1,69	V292A	0,79	T388A	0,44
V127A	1,44	K293A	0,96	N392A	0,76
N130A	0,69	N295A	0,94	S393A	0,92
S158A	0,01	T297S	1,22	T394A	0,78
N160K	0,11	R298A	NT	W395A	0,22
T162A	0,75	P299A	5,74	N411A	0,16
I165A	1,46	N301A	0,83	D412A	1,06
R166A	1,32	N302A	0,55	I414A	0,55
D167A	1,66	T303A	0,63	I415A	5,29
K168A	0,95	R304A	0,91	P417A	0,68
V169K	0,03	K305A	2,08	R419A	1,23
K171A	0,82	S306A	0,59	I420A	10,70
E172A	1,21	I307A	7,75	K421A	9,67
Y173A	1,20	H308A	0,61	Q422A	1,38
L175A	1,32	I309A	1,63	I423A	10,12
Y177A	1,96	P313A	0,15	I424A	4,90
L179A	0,74	R315A	0,74	N425A	1,00
V182A	1,20	R315Q	0,70	V430A	0,47
I184A	1,31	F317A	2,34	K432A	1,59
D185A	0,93	T319A	0,82	Y435A	3,49
K186insA	1,04	T320A	0,85	I439A	0,86
N186A	0,97	E321insA	0,47	T450A	1,15
N187A	0,92	G321A	0,75	T455A	0,57
T189A	0,90	I322A	1,10	R456A	3,40
N197A	2,43	D325A	0,04	E462A	1,32
N197K	0,91	I326A	0,44	S463A	1,18
N197T	1,39	R327A	3,36	E466A	0,84
T198A	1,15	H330A	>16	I467A	0,66
S199A	0,87	N332A	>16	F468A	0,99
T202A	1,83	N332Q	5,46	P470A	0,64

C

env autologue et mutation	Lignée A				Lignée B				
	V48-7A	V54-1A	V48-13A	V60-3A	V54-5B	V48-17B	V54-14B	V60-6B	V60-19B
	Rapport IC50 virus Mutant / WT								
V18-49 N295A	1,19	11,1	2,19	1,65	0,79	0,99	0,31	0,24	0,65
V24-69 N295A	4,30	>3,48	9,2	2,87	16,9	15,3	2,03	1,82	1,65
V18-49 N300H	>999	>125	>709	>326	16,7	64	1,92	2,33	4,30
V12-27 N301A	>85	393	0,75	0,61	NN	NN	0,04	0,12	NN
V18-49 N301A	2,46	15,3	65	2,97	1,25	1,21	0,74	0,98	1,23
V18-49 N295A-N301A	12,9	>125	>709	31	2,13	2,73	0,39	0,21	1,36
V30-119 N301A	NN	NN	>54	NN	2,74	3,06	0,16	0,25	1,44
V18-49 I309A	1,73	0,72	2,40	1,78	2,10	1,03	0,71	1,10	0,99
V18-49 F317A	1,92	3,03	2,41	5,2	5,6	2,13	1,40	2,04	3,90
V18-49 D321A	2,56	0,72	1,09	1,68	1,03	1,05	0,63	1,19	1,15
V18-49 I322A	5,8	>67	123	6,2	1,90	2,99	2,32	1,38	3,46
V18-49 I323A	2,53	5,5	9,2	3,34	1,33	1,12	1,31	1,44	1,10
V18-49 G324A	4,07	9,9	20	3,01	3,52	2,70	2,10	2,09	2,32
V12-27 N325D	3,03	1,67	1,83	1,60	<0,08	<0,01	0,44	0,39	<0,08
V18-49 D325N	0,24	0,95	0,58	0,48	27	>110	1,05	1,36	2,99
V18-49 I326A	1,80	5,7	5,6	1,50	19,5	39	1,54	1,25	1,73
V18-49 R327A	9,5	>49	365	55	>55	>87	58	1,14	>47
V18-49 Q328A	1,35	3,57	7,8	0,82	1,22	1,30	0,98	1,04	1,05
V18-49 H330A	>1014	>49	>709	>271	0,75	0,71	0,36	0,53	0,73
V18-49 N332A	>999	>125	>709	>326	0,29	0,62	0,07	0,08	0,12
V18-49 S334A	>1014	>49	>709	>271	0,52	1,19	0,07	0,08	0,16
V24-69 N332A	>942	>3,48	>54	>361	>19,4	>116	5,9	0,16	0,47
V12-27 +N334	>85	>1036	>3419	>344	NN	NN	13,5	0,58	NN
V30-119 N334S	NN	NN	>54	NN	2,90	1,43	0,19	0,31	1,27
V18-49 E335A	0,67	0,25	1,05	0,60	1,14	0,77	0,63	0,98	0,71
V18-49 S336A	1,27	1,05	1,99	1,10	1,13	0,79	1,15	1,02	0,98
V24-69 N339A	1,16	1,88	2,32	0,79	0,93	0,93	1,31	0,99	1,04
V18-49 N386A	1,04	5,6	1,96	1,91	0,86	0,84	0,43	0,43	0,67
V24-69 N386A	0,62	0,98	2,87	0,55	0,38	0,51	1,24	1,24	0,71
V12-27 N392A	0,39	0,28	0,64	0,44	NN	NN	0,88	0,74	<0,64
V18-49 +N392	0,67	1,77	1,11	0,96	0,88	1,09	0,54	0,98	1,25
V24-69 N392A			1,09				0,72	0,65	
V18-49 K421A	2,50	5,9	4,85	3,67	1,34	1,33	1,25	0,98	1,34

Rapport ID50 Mutant / WT				
	< 0,5	gain	2-20	perte
	0,5 - 2	neutre	> 20	forte perte
NN	WT et mutant non neutralisés			

Figure IV-9 : Légende page précédante

La neutralisation par les anticorps de la lignée A était perdue sur les mutants N332A de 10 virus hétérologues (Figure IV-9A). Les doubles mutants de glycanes N332 avec N295, N301, N339, N386 ou N392 abolissaient également la neutralisation. De plus, des diminutions de neutralisation étaient observées sur quelques virus pour la suppression des glycanes N295, N301 et N392, mais ces mutations étaient sans effet sur JRCSF ce qui pourrait indiquer que ces glycanes n'étaient pas strictement obligatoires dans l'interaction, mais y participaient dans certains cas. En revanche la mutation des glycanes N197 et N262 diminuaient la neutralisation de JRCSF (Figure IV-9B). La suppression du glycane N156 entraînait une perte de neutralisation de JRFL. Au contraire, elle entraînait l'augmentation de la neutralisation sur JRCSF. Ce glycane N156 était donc certainement à proximité de l'épitope dont il pouvait faire partie dans certains contextes viraux. La lignée A avait donc une dépendance obligatoire pour le glycane N332. Des interactions complémentaires avec les glycanes N156, N262, N295, N301 et N392 étaient probables au vue de ces résultats. Cependant, la plupart des anticorps ciblant la région du patch riche en mannose n'interagissent pas avec autant de sucres simultanément et il doit donc s'agir d'une promiscuité d'usage alternatif des glycanes différent pour chaque trimère, comme décrit pour de nombreux anticorps *(Sok, Sci Transl Med, 2014).*

D'autres mutations augmentaient la neutralisation de JRCSF, aux positions N160 et V169 des boucles V1 et V2 ainsi que la mutation de la proline 313 au sommet de la boucle V3 positionnée au contact avec les autres protomères. Les boucles V1 et V2 pourraient donc avoir un effet indirect sur la conformation de la boucle V3 et son accessibilité. La déstabilisation du contact entre les protomères qui favoriserait une conformation ouverte de la protéine d'enveloppe semblait favorable à la neutralisation. Au niveau du motif conservé de quatre acides aminés GDIR entre les résidus 324 et 327 à la base de la boucle V3, la mutation R327A diminuait la neutralisation de JRCSF. Au contraire, la mutation D325A augmentait la neutralisation de JRCSF et la mutation D325N celle de JRFL ce qui signifie que les anticorps parviennent à accommoder l'acide aspartique ou l'asparagine dans l'épitope, mais que leur présence n'est pas très favorable à l'interaction. Les mutations N300H et H330A impactaient fortement la neutralisation de JRFL et JRCSF. Plusieurs autres positions de la boucle V3 apparaissaient comme importantes pour la neutralisation : P299, K305, I307, F317. Enfin, la mutation de positions dans la région constante C4 (I415, I420, K421 et I423) diminuait la neutralisation de JRCSF. Cette région sous-jacente aux boucles V1 à V3 pouvait être contactée directement par les anticorps, mais elle avait plus probablement un impact indirect sur la conformation des autres boucles.

Les mutants de pseudovirus autologues ont été testés pour la neutralisation par 4 anticorps de la lignée A dont les deux meilleurs en termes de largeur de spectre (V60-3A et V48-13A), le moins bon (V48-7A), et l'unique anticorps issus de 54 mpi (V54-1A) (Figure IV-9C). Leurs comportements face aux mutations étaient peu contrastés, ce qui signifiait qu'ils reconnaissaient de trimère d'enveloppe d'une manière très similaire. La suppression du glycane N332 sur les pseudovirus de 18 et 24 mpi et le basculement du glycane en position

N334 sur le pseudovirus de 12 mpi abolissaient la neutralisation pour tous les anticorps. Le basculement du glycane N334 en position N332 sur le variant d'échappement de 30 mpi ne permettait pas de rétablir la neutralisation. La suppression des glycanes N295 et N301 ainsi que la double mutation N295A-N301A impactaient fortement la neutralisation, confirmant que ces glycanes étaient centraux dans l'interaction. Au contraire, peu ou pas d'effets étaient observés pour la mutation des glycanes N339, N386 et N392. Au niveau du motif GDIR, les mutants des résidus I322, I323, G324, I326, mais plus encore R327 diminuaient la neutralisation. Une très légère préférence était observée pour une asparagine en position 325, ce qui corroborait la cartographie sur virus hétérologue. Enfin, les mutations H330A et N300H abolissaient la neutralisation.

L'effet de la suppression du glycane N332 sur la neutralisation par les anticorps de la lignée B était plus mitigé. La mutation abolissait la neutralisation de JRFL et ADA et diminuait la neutralisation de la plupart des anticorps sur DU156 et DH12. De nombreux anticorps toléraient l'absence du glycane N332 sur BaL, 92RW020, 92BR020 et SF162. Enfin, sur TRO11, la mutation augmentait la neutralisation d'un facteur 5 en moyenne. La suppression des glycanes N295 et N301 diminuait la neutralisation de quelques virus, notamment JRFL pour lequel ces mutants abolissaient la neutralisation. Au contraire, la suppression des glycanes N386 et N392 augmentait la neutralisation de 92BR020 quand les mutants N295A et N301A n'avaient pas d'effet sur ce virus. Cependant, il était possible que l'interaction avec 92BR020 puisse dépendre du glycane N301 quand le glycane N332 était absent, puisque la double mutation N332A-N301A avait un effet supérieur à l'effet des mutations simples. De même, la mutation N332A-N295A sur 92RW020 avait un effet qui ne pouvait pas être expliqué par la seule suppression du glycane N332. Il semblait donc que les anticorps de la lignée B aient également la possibilité d'utiliser alternativement plusieurs glycanes pour permettre la neutralisation de virus très variés. Le glycane N332 ne serait ainsi pas toujours indispensable si des glycanes environnant peuvent s'y substituer. Les mutations N300H et D325N diminuaient la neutralisation de JRFL. Les anticorps de la lignée B semblaient ainsi préférer le motif GDIR au motif moins commun GNIR contrairement aux anticorps de la lignée A.

Cinq anticorps de la lignée B ont été choisis pour la cartographie de la spécificité sur les virus autologues dont les trois meilleurs en termes de largeur de spectre (V54-14B, V60-6B et V60-19B), le moins bon (V54-5B) et un anticorps issu de 48 mpi. Comme observé sur TRO11, mais pas sur les autres virus hétérologues, la suppression du glycane N332 sur le virus autologue de 18 mpi tendait à améliorer la neutralisation des trois anticorps ayant la meilleure largeur de spectre. La suppression du glycane sur le virus de 24 mpi augmentait également la neutralisation des deux meilleurs anticorps, mais diminuait fortement la neutralisation des trois autres anticorps. Les anticorps ayant la moins bonne largeur de spectre apparaissaient plus sensibles à la mutation des glycanes N295, N301 et N332 sur les virus autologues. Autrement dit, les anticorps les plus matures avaient une meilleure tolérance à la suppression des glycanes et pouvaient même améliorer leur neutralisation en

leur absence, ce qui pourrait s'expliquer par une meilleure accessibilité aux résidus protéiques de la boucle V3. En effet, les anticorps semblaient dépendre plus fortement des résidus protéiques que de la présence des glycanes. Au niveau du motif GDIR, la mutation R327A sur le virus de 18 mpi abolissait ou diminuait fortement la neutralisation, sauf pour l'anticorps V60-6B. La mutation D325N diminuait la neutralisation de trois des anticorps et la mutation inverse N325D sur le virus de 12 mpi améliorait la neutralisation, confirmant bien la préférence pour un acide aspartique à cette position. Les mutations N300H, F317A, I322A et G324A avaient également un impact négatif sur la neutralisation du virus de 18 mpi.

En conclusion sur la cartographie de l'épitope, les lignées A et B semblaient avoir des modes d'interaction différents avec la protéine d'enveloppe comme l'a fait apparaître la représentation des résidus cartographiés sur la structure du trimère (Figure IV-10).

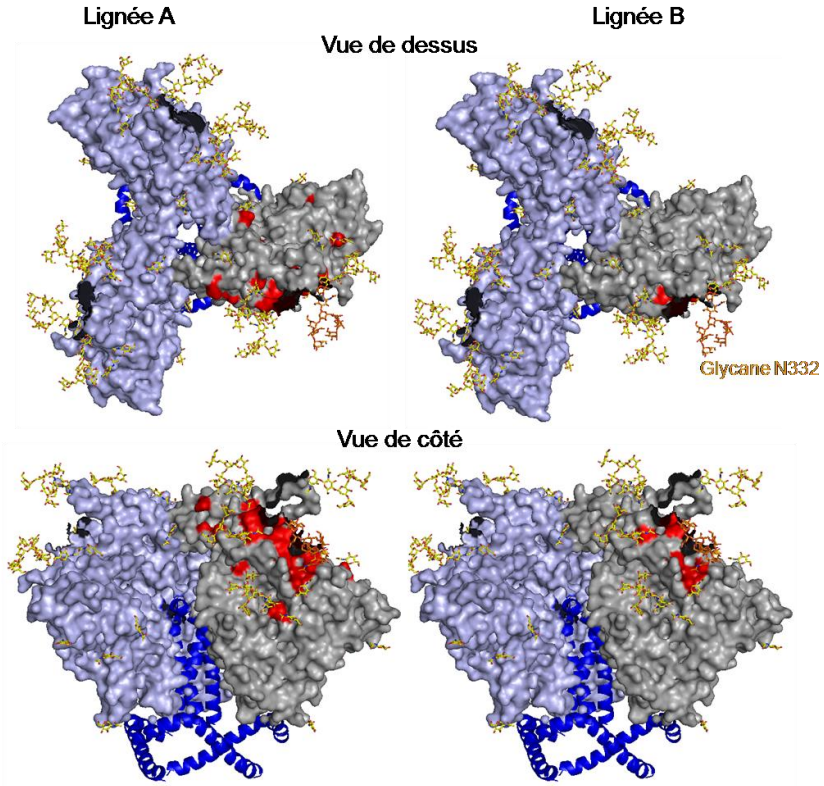


Figure IV-10 : Résidus cartographiés de l'épitope des lignées A et B (rouge) représentés sur la structure du trimère soluble BG505 en complexe avec PGT122. PBD : 4NCO. Les protomères de gp120 (gris et violet), la gp41 (bleu), et les glycanes (jaune) sont représentés. PGT121 est masqué, mais ses points de contact avec le trimère sont montrés (noir).

- **Le raccourcissement des glycanes améliore la neutralisation des anticorps des deux lignées**

Nous avons montré que les anticorps de la lignée A dépendaient de glycanes pour neutraliser les virus hétérologues et autologues, avec une dépendance stricte pour le glycane N332 et une dépendance probable, complémentaire ou contextuelle pour les glycanes N156, N262, N295, N301 et N392, contenant tous principalement des sucres riches en mannoses *(Behrens, Cell Reports, 2016).* L'implication des sucres dans l'interaction de la protéine d'enveloppe avec les anticorps de la lignée B semblait moins importante, mais certains anticorps perdaient de l'activité sur des pseudovirus sans glycanes N332, N295 et N301. Pour investiguer la composition des glycanes nécessaire à l'interaction, nous avons testé la neutralisation de 12 pseudovirus portant des sucres modifiés par deux inhibiteurs de glycosidase, la kifunensine et la swainsonine, ou produits dans la lignée cellulaire HEK293S qui est déficiente pour la glycosyltransférase GnTI (Figure IV-11). La processivité des glycanes est bloquée à différentes étapes de leurs synthèses.

env	92RW020	DH12	TRO11	JRFL	SS1196	BaL	92BR020	JRCSF	DU156	93IN905	V12-27	V18-49	
Rapport d'IC50 pseudovirus produit en HEK293T sans traitement / pseudovirus traité ou produit en HEK293S													
mAbs	HEK293S cellules déficiente pour GnTI												**Moyenne**
V48-13A	2,7	0,3	11,9	12,4	250	1,8	<0,7	120	2714	7,2	541	8,8	306
V48-7A	NN	0,2	35	>239	12,9	NN	NN	33	2258	44	23	6,1	294
V54-1A	NN	0,3	10,7	168	614	7,5	NN	>99	117	29	5380	100	652
V54-14B	2,7	0,3	6,2	2,1	5,7	2,4	2,8	5,1	7,5	3,6	11,0	6,5	4,7
V60-19B	2,3	0,4	2,4	3,8	5,9	2,7	2,2	>5	8,3	2,2	94	3,2	11,1
V54-5B	1,6	1,3	20	28	>6	2,8	1,8	>2	54	5,2	>46	5,9	14,6
PG9	2,7	1,2	>7,8	NN	47	NN	>115	0,5				2,7	25
2G12	1,2	1,3	2,1	7,6	11,3	4,5	17,6	2,9				NN	6,1
mAbs	Traitement Kifunensine												**Moyenne**
V48-13A	2,4	1,2	9,0	22	192	23	13,3	5,6	5,9	9,1	6,3	4,6	25
V48-7A	NN	0,8	22	>375	3,0	>7	NN	NN	12,2	13,4	5,0	3,5	49
V54-1A	NN	0,5	7,3	315	119	14,4	>2	NN	26	11,8	10,9	31	54
V54-14B	3,8	0,4	3,3	3,5	3,8	3,6	4,3	3,7	4,6	2,4	19,0	12,4	5,4
V60-19B	1,9	0,5	7,7	4,7	3,0	2,8	3,5	>1,1	6,4	1,6	75	3,9	9,3
V54-5B	2,2	2,0	8,2	42	>9	7,0	3,2	NN	17,2	3,1	>42	7,4	13,0
PG9	<0,02	<0,02	NN	NN	<0,3	NN	NN	<0,001	0,01		NN	<0,03	0,1
2G12	6,0	29	1,3	37	3,3	21	57	3,2	>966		9,4	>120	114
mAbs	Traitement Swainsonine												**Moyenne**
V48-13A	1,0	0,6	5,2	6,3	7,2	4,4	1,9	8,2	3,2	6,1	3,1	3,0	4,2
V48-7A	NN	0,1	5,7	>13	4,9	NN	NN	4,7	7,6	3,6	10,7	2,5	5,9
V54-1A	NN	0,9	10,5	42	22	49	NN	>3	20	10,1	7,7	27	19,2
V54-14B	1,8	0,6	4,2	3,4	6,2	3,0	3,7	2,6	7,4	2,6	4,4	3,2	3,6
V60-19B	1,1	0,8	2,6	3,1	3,2	3,5	3,3	>3	7,2	1,6	24	2,4	4,7
V54-5B	1,0	2,0	2,2	5,8	>1	4,5	3,4	NN	19,1	1,5	>12	3,5	5,1
PG9	4,6	7,9	>2,1	>2	64,8	NN	>21	3,5	10,1		>48	2,3	16,7
2G12	1,3	1,0	1,4	3,1	2,6	1,9	6,5	2,8	NN		6,1	NN	3,0

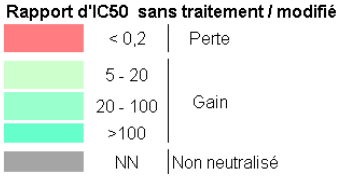


Figure IV-11 : Neutralisation de pseudovirus portant des sucres modifiés. Neutralisation par trois anticorps de chaque lignée et par les anticorps contrôles PG9 et 2G12 de 12 pseudovirus portant des sucres modifiés par la production en cellules HEK293S déficientes pour la glycosyltransférase GnTI ou par ajout de kifunensine ou swainsonine pendant la production en cellules HEK293T. Les résultats sont exprimés en rapport d'IC50 de pseudovirus produit en HEK293T sans traitement divisé par l'IC50 de pseudovirus modifiés. Les résultats sont des facteurs de réduction d'IC50, soit une amélioration de l'activité neutralisante. Les nuances de vert représentent un gain d'activité neutralisante et le rouge représente une perte. Voir pour rappel l'effet des glycanes figure I-5.

Les modifications des pseudovirus ont été contrôlées par neutralisation des anticorps PG9 et 2G12. PG9 perdait de l'activité sur les pseudovirus produits en présence de kifunensine et augmentait son activité sur la plupart des pseudovirus produits en présence de swainsonine ou en cellules HEK293S, ce qui correspondait aux résultats attendus *(Doores, J Virol, 2010 ; Upadhyay, Plos Pathog, 2018)* et s'expliquait par une préférence pour la liaison à $Man_5GlcNac_2$ *(McLellan, Nature, 2011).* L'activité de 2G12 augmentait sur les virus produits en présence de kifunensine et dans une moindre mesure sur quelques virus produits en HEK293S et en présence de swainsonine de façon cohérente avec sa préférence pour $Man_9GlcNac_2$ *(Calarese, PNAS, 2005).*

La neutralisation des anticorps de PC94 était améliorée par les trois types de modifications, particulièrement pour les anticorps de la lignée A. La production des pseudovirus en HEK293S avait le plus fort impact sur la lignée A avec une amélioration des IC50 d'un facteur moyen de 300 à 600. L'effet de la kifunensine et de la swainsonine était moins important, mais l'augmentation des IC50 sur tous les anticorps était substantielle.

L'impact plus modéré sur la neutralisation des anticorps de la lignée B a conforté l'hypothèse d'une plus faible implication des sucres dans l'interaction avec ces anticorps, illustrée notamment par une certaine tolérance à la suppression du glycane N332.

La swainsonine prévient la formation de sucres complexes. L'amélioration modérée de la neutralisation des pseudovirus traités à la swainsonine signifiait que la fixation des anticorps ne dépendait pas de sucres complexes, ce qui était prévisible puisque ces sucres ne sont normalement pas présents dans le patch riche en mannose. Leur présence sur des sites adjacents au patch riche en mannose semblait au contraire avoir un rôle négatif sur la fixation des anticorps, certainement par effet d'encombrement latéral au site de fixation des anticorps.

L'amélioration considérable de la neutralisation par l'absence de la glycosyltransférase GnTI peut être interprétée comme une préférence pour la fixation aux glycanes à 5 mannoses. Cependant, la kifunensine prévient le clivage de Man_8 et Man_9 en Man_5 et provoquait une nette amélioration de l'activité neutralisante. Ceci signifiait donc que les glycanes à 5 mannoses n'étaient pas la seule forme reconnue. Des résidus de sucres structurés similairement dans les glycanes contenant entre 5 et 9 mannoses pouvaient promouvoir pareillement l'interaction. Plutôt qu'une reconnaissance des mannoses terminaux, ce serait donc les mannoses proximaux ou les deux résidus GlcNac à la base du glycane qui formeraient l'interaction. Ceci corroborerait l'amélioration de la neutralisation en l'absence de sucres hybrides et complexes environnants le site de fixation.

Cependant, une deuxième interprétation doit être envisagée à la lumière des informations suivantes. Contrairement à d'autres protéines, la production de trimère d'enveloppe du VIH en cellules HEK293S n'aboutit pas à un contenu uniforme en Man_5. En effet, le trimère gp140 KNH1144 produit en HEK293S contient à peu près autant de Man_5,

Man_8 et Man_9 *(Eggink, Virology, 2010).* La composition du patch riche en mannose est certainement peu impactée par la production en cellules HEK293S, car les mannosidases du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi ont un accès limité aux glycanes de cette région indépendamment de la présence de la GnTI à l'étape d'élongation suivante. La forte augmentation de la neutralisation sur les pseudovirus produits en cellules HEK293S ne serait donc pas l'effet d'un enrichissement en Man_5, mais de l'altération de sucres hybrides ou complexes sur des glycanes environnants qui améliorerait l'accès des anticorps aux glycanes riches en mannose du patch et éventuellement à des éléments protéiques sous-jacents. Enfin, l'activité augmentée sur les pseudovirus produits avec de la kifunensine signifierait que les glycanes contenant 8 ou 9 résidus mannoses sont préférentiellement reconnus par ces anticorps.

L'étude de la fixation directe des anticorps à des sucres synthétiques sur puce permettrait probablement de trancher cette question. Toutefois, l'interaction des anticorps avec les sucres peut parfois être trop faible pour être détectée avec cette méthode, particulièrement si leur affinité pour le trimère n'est que très partiellement médié par les sucres comme cela semble être le cas des anticorps de la lignée B.

Partie 3) Discussion

- **L'activité neutralisante n'était pas corrélée aux taux de mutations et aux temps d'isolement**

L'analyse de la neutralisation autologue des deux lignées a permis de dater l'apparition de la lignée A avant 12 mpi et de la lignée B aux alentours de 12 mpi. La période d'isolement des anticorps entre 48 et 60 mpi représentent donc une période assez restreinte d'un an et distante d'au moins trois ans de l'apparition des lignées. Nous avons donc échantillonné des anticorps fruits d'une forte évolution et nous manquons d'anticorps plus précoces ou intermédiaires en termes de largeur de spectre et de taux de mutation. De ce fait, la séquence de l'anticorps du lymphocyte B naïf n'a pas pu être inférée et les taux de mutations calculés sont donc biaisés.

Pendant cette période d'un an entre 48 et 60 mpi, la largeur de spectre de la neutralisation du sérum sur 37 virus semble continuer à progresser. En revanche, les anticorps isolés ne reflètent pas un gain de neutralisation sur la période avec des anticorps de largeur de spectre relativement faible coexistant avec les anticorps les plus matures à chaque temps. De plus, le temps d'isolement, la divergence génétique par rapport à la séquence de référence IMGT, la largeur de spectre et l'affinité ne sont pas corrélés. Afin de déterminer si l'anticorps de plus faible largeur de spectre est plus proche de la séquence réelle du lymphocyte B naïf, nous avons contrôlé la divergence génétique à cet anticorps. Dans ces conditions non plus, les anticorps ne s'organisent pas par temps d'isolement ou largeur de spectre.

L'absence de corrélation entre les différentes caractéristiques des anticorps a été déjà observée pour la lignée d'anticorps ciblant la région N332 issue du donneur PC39. Les 36 anticorps isolés entre 17 et 61 mpi possèdent entre 13 et 21 % de mutations sur la chaîne lourde et ces taux n'ont pas une relation stricte avec le temps d'isolement ou la largeur de spectre. Cependant, les anticorps forment des groupes de similarités génétiques basés entre autre sur la longueur des insertions dans le CDRH1. Ces groupes forment des branches distinctes dans l'arbre phylogénétique des chaînes lourdes séquencées par nouvelle génération. Au sein de chaque groupe, les mutations sont acquises progressivement au cours du temps et coïncident le plus généralement avec une amélioration de la largeur de spectre.

On pourrait faire la même hypothèse pour les anticorps des lignées A et B de PC94. Il se pourrait que des anticorps moins mutés apparaissent plus tardivement, car ils appartiennent à des branches distinctes ayant pu diverger assez précocement dans l'évolution des lignées. Chaque branche poursuit sa maturation sur la période par acquisition de nouvelles hypermutations somatiques améliorant la largeur de spectre et expliquant en

partie l'amélioration du score de neutralisation sur la période. Ainsi, pour quatre virus, on peut montrer qu'ils commencent à être neutralisés efficacement par le sérum au moment où des anticorps de l'une ou l'autre des lignées capables de les neutraliser apparaissent. En revanche, une partie de la neutralisation du sérum n'est expliquée par aucun anticorps isolé.

- **D'autres anticorps doivent compléter la récapitulation de l'activité du sérum**

Nous avons vu que l'activité du sérum contre la plupart des virus du panel de 37 virus est récapitulée par au moins un anticorps de l'une ou l'autre des lignées. Cependant, 6 virus ne sont neutralisés par aucun anticorps bien qu'ils soient neutralisés par le sérum. Il y a plus d'une façon de l'expliquer, mais nos données actuelles ne permettent pas de trancher pour l'une ou l'autre des hypothèses suivantes.

D'abord, des anticorps plus matures de ces deux mêmes lignées, qui n'auraient pas été échantillonnés, pourraient expliquer l'intégralité de la largeur de spectre du sérum. Dans ce cas, soit les anticorps existent dans les échantillons traités, mais n'ont pas pu être récupéré à cause d'un rendement trop faible de l'expérience (marquage, tri cellulaire, amplification PCR ou clonage), soit ils ne sont pas présents dans le répertoire de lymphocytes B mémoires aux temps testés, mais sont apparus à des temps plus tardifs.

Une autre explication pour la non récapitulation de l'activité du sérum, serait que les anticorps manquant ne fassent pas partie des mêmes lignées, voire qu'ils ne ciblent pas la même région de la protéine d'enveloppe. Pour confirmer la spécificité des anticorps responsables de la neutralisation des six virus non neutralisés par les lignées A et B, nous proposons de tester la neutralisation par le sérum de mutants N332A des virus en question. Si le sérum neutralise ces virus malgré la suppression du glycane N332, il est probable que les anticorps qui expliquent cette neutralisation reconnaissent un autre épitope. Dans ce cas, il faudra procéder à une cartographie des autres régions conservées du trimère en mesurant l'impact des mutations des différentes régions sur la neutralisation de ces virus. Par contre, si ces expériences suggèrent que les anticorps manquant ciblent la région N332, ils pourraient correspondre aux nombreux lymphocytes triés mais non testés, ou qui ont échappé au tri, parce qu'ils ne reconnaissent pas bien les appâts, même sauvages. Les données préliminaires de cartographie ont montré que la plupart de l'activité neutralisante à large spectre était perdue pour le sérum déplété des anticorps se fixant à la gp120 recombinante monomérique 92BR020 sauvage, utilisée pour le tri cellulaire. Cependant, la neutralisation du sérum déplété n'a pas été testée sur les six virus dont la neutralisation n'est pas récapitulée par les anticorps des lignées A et B. On ne sait donc pas si les anticorps neutralisants ces virus peuvent se fixer à cet appât. De plus, on ne sait pas si la gp120 recombinante monomérique IAVIC22, également utilisée comme appât pour le tri cellulaire, permet de dépléter l'activité du sérum. On peut imaginer par exemple, que les anticorps manquant ont une dépendance obligatoire au glycane N295, qui est absent de la séquence

de IAVIC22, ou encore une dépendance à la structure quaternaire de la protéine d'enveloppe qui n'est pas reconstituée sur l'appât gp120 monomérique. Pour tester cette hypothèse, nous proposons de vérifier l'activité neutralisante du sérum déplété des anticorps se fixant à la gp120 monomérique IAVIC22.

▪ Ces anticorps apportent des informations supplémentaires sur les conditions dans lesquelles la neutralisation à large spectre est acquise

➢ Taux de mutation et durée d'évolution

La neutralisation à large spectre est observée pour un anticorps de la lignée B ayant un taux de mutation modéré. En effet, le deuxième anticorps isolé le moins muté est paradoxalement le meilleur en termes de neutralisation. Avec 13,7% de mutations de nucléotide sur la chaîne lourde, V54-14B neutralise 27% du large panel de Seaman. Concernant la lignée A, les anticorps les moins mutés isolés ont 15% de mutations de nucléotides sur la chaîne lourde et l'un d'entre eux isolés à 60 mpi, V60-3A, neutralise 23% du panel de Seaman. A titre de comparaison, un anticorps de la lignée ciblant la région N332 du donneur PC76, atteint 47% de neutralisation du panel de Seaman avec 11,6% de mutations sur la chaîne lourde. De façon très similaire, un taux de mutations de 11,3% permet à un anticorps de la lignée issue du donneur PC39, de neutraliser 36% du panel de Seaman. Ainsi, un taux d'hypermutations somatiques d'environ 10-15% semble nécessaire à l'acquisition d'une neutralisation hétérologue à large spectre contre la région N332.

L'évolution de ces quatre lignées à large spectre suit des cinétiques relativement similaires. Au vu de la neutralisation autologue, il semble que les lignées A et B du donneur PC94 aient été induites vers 12 mpi ou plus précocement. Les lignées des donneurs PC76 et PC39 ont également été induites dans la première année d'infection, avec l'identification par séquençage nouvelle génération de la première occurrence d'une séquence de chaîne lourde apparentée à 16 mpi pour PC76 et 9 mpi pour PC39.

Chez ces trois donneurs, l'apparition de l'activité neutralisante à large spectre est distante de l'induction des lignées identifiées d'environ 2 ans. En effet, l'activité neutralisante à large spectre par le sérum de PC94 est atteinte vers 36 mpi. Celle du sérum du donneur PC76 apparaît à 33 mpi. Enfin, l'activité neutralisante à large spectre semble se développer plus rapidement chez le donneur PC39, qui l'atteint dès 24 mpi, après environ 15 mois de maturation de la lignée.

➢ Indels

De façon intéressante, la lignée B ne possède pas d'insertions ou de délétions et un CDRH3 d'une longueur modeste de 18 acides aminés. En revanche, la lignée A possède un CDRH3 plus long, de 23 acides aminés, et a subi un évènement d'insertion ou de délétion sur la chaîne légère. L'acide aminé en question est à la jonction entre le fragment V et le

fragment J et il n'est pas possible d'affirmer quelle séquence possédait le lymphocyte B naïf à cet endroit. Le résultat est un acide aminé en moins pour quatre anticorps de la lignée A, parmi les meilleurs.

- Utilisation de gène

L'usage de gènes d'immunoglobuline se distingue de nombreux anticorps ciblant la région N332 qui utilisent des gènes de la famille VH4. L'importance de cet usage fréquent n'a pas été investiguée, mais on sait que les lignées adoptent des solutions très contrastées pour l'interaction avec le trimère, quand bien même elles dérivent de lymphocytes B naïfs très proches comme c'est le cas des lignées de PC76 et PC39.

Le sous-type D, qui infecte ce donneur, est peu représenté chez les donneurs dont les lignées neutralisantes à large spectre ont été issues. Le virus autologue de ce donneur pourrait avoir des caractéristiques inédites qui expliquerait qu'il ait engendré une neutralisation à large spectre.

▪ La coévolution du virus autologue avec les anticorps suggère des mécanismes d'induction et d'échappement viral.

La mise en relation des résultats de cartographie de l'épitope avec l'évolution des virus autologues peut permettre de proposer des mécanismes de coévolution entre les anticorps et le trimère d'enveloppe. Deux phases importantes peuvent ainsi être expliquées. La première est l'induction de la lignée par l'activation d'un lymphocyte B naïf qui dépend de la reconnaissance de caractéristiques uniques de la protéine d'enveloppe. La compréhension de cette interaction est primordiale pour une stratégie vaccinale basée sur l'activation d'une lignée à potentiel de neutralisation hétérologue à large spectre. La deuxième phase qui doit être expliquée est l'échappement viral qui se produit lorsque les anticorps ne sont plus capables de s'adapter aux mutants d'échappement viraux. Dans le cadre d'un vaccin prophylactique produisant une immunité stérilisante, les anticorps induits ne devraient pas avoir à faire face à l'évolution du virus transmis, puisque l'infection serait stoppée à un stade très précoce, avant que le virus n'ait pu se diversifier. Cependant, l'analyse de l'échappement dans l'infection naturelle peut permettre de comprendre quelles caractéristiques sont indésirables pour le développement d'un immunogène et quelles sont les vulnérabilités des anticorps face à la variabilité virale intra-hôte ou inter-hôte.

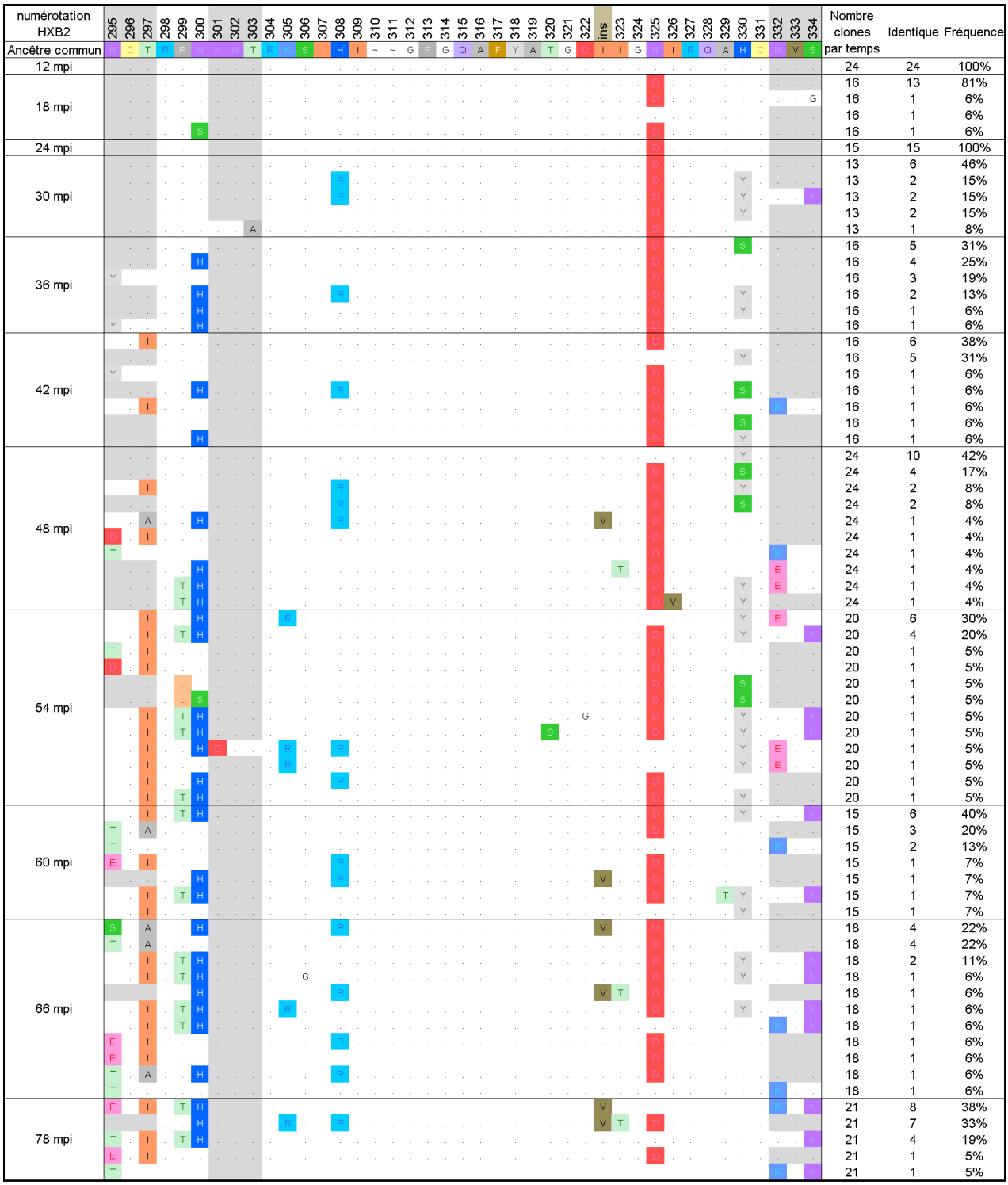
- Induction des lignées

Concernant l'induction de la lignée A, étant donné que les variants de 12 mpi sont tous neutralisés de façon très efficace et que des variants plus précoces ne sont pas disponibles, nous ne sommes pas en mesure de discuter des caractéristiques de la protéine d'enveloppe nécessaire à l'activation du lymphocyte B.

Concernant l'induction de la lignée B, nous savons qu'elle a dû se produire aux alentours de 12 mpi. De façon remarquable, l'asparagine en position 325 dans le motif GN/DIR est conservée chez les virus autologues de 12 mpi qui ne sont pas neutralisés par les anticorps de la lignée B (Figure IV-12). A 18 mpi, la mutation en acide aspartique devient ultra-majoritaire et le reste jusqu'à 42 mpi ou l'asparagine à cette position réapparaît pour quelques variants viraux. La préférence des anticorps de la lignée B pour le motif plus commun GDIR est évidente puisque cette mutation N325D dans le virus de 12 mpi permet ou améliore la neutralisation, tandis que la réversion en asparagine dans le virus de 18 mpi diminue la neutralisation. Outre cette mutation, la boucle variable V3 et ses environs proches mutent très peu entre 12 et 18 mpi. La mutation N325D est donc certainement l'évènement clé qui a permis l'induction de la lignée B. Le clone V12-27 qui est le variant le mieux neutralisé à 12 mpi porte une asparagine à cette position. On peut émettre l'hypothèse qu'une protéine d'enveloppe très proche du clone V12-27 ayant muté la position 325 en acide aspartique est à l'origine de l'activation du lymphocyte B naïf. Pour confirmer cette hypothèse, l'UCA devrait être identifié par séquençage nouvelle génération des gènes d'immunoglobulines du répertoire total et testé pour la neutralisation ou la liaison à ce variant.

- Echappement viral

La conservation d'une mutation, mais plus encore la mutation répétée d'une position dans l'évolution virale peut être l'évidence d'une pression de sélection exercée par des anticorps à ces positions. Une telle activité mutationnelle est un indice à exploiter pour comprendre l'échappement viral. L'évolution de la boucle V3 des virus autologues de PC94 est peu importante, mais quelques mutations sont conservées. La mutation de l'acide aspartique en position D325 est conservée à partir de 18 mpi. A partir de 30 mpi, la position H308 est modifiée en arginine de façon ponctuelle et la position H330 est modifiée en tyrosine ou en sérine. Une mutation en histidine de l'asparagine N300 apparaît à 36 mpi. Quelques autres modifications se produisent plus tardivement, comme la mutation de la proline 299 à 54 mpi. Les glycanes N332, N295 et N301 semblent être les glycanes les plus importants dans l'interaction des deux lignées d'anticorps avec le trimère d'enveloppe, même si une partie des anticorps de la lignée B tolèrent leurs délétions. Le glycane N301 est conservé tout au long de l'évolution du virus autologue. Le glycane N332 n'est que très occasionnellement muté au début de l'évolution virale. A 54 mpi, la mutation N332E ou la mutation S334N suppriment le glycane N332 pour trois quart des virus autologues. Le site de glycosylation n'est plus présent que pour 36 à 65 % des variants entre 60 et 78 mpi. Le site de glycosylation N295 est conservé jusqu'à 36 mpi ou quelque variants suppriment ce site, puis à partir de 54 mpi, l'essentiel des virus ne portent pas de glycane N295.



IV-12 : Evolution de la boucle V3 des gènes d'*env* autologues de PC94 entre 12 et 78 mpi. Les séquences issues du séquençage par Monogram Biosciences sont alignées avec un point pour chaque résidu identique par rapport à l'ancêtre commun. Les sites potentiels de N-glycosylation au position N295, N301 et N332 sont grisés. La fréquence de chaque séquence unique de la boucle V3 est indiquée à droite.

L'échappement viral de la lignée A se produit certainement par plusieurs vagues, avec l'apparition de variants échappant à la neutralisation de certains anticorps dès 18 mpi. Ces mêmes anticorps sont néanmoins capables de neutraliser deux à trois virus sur huit clones de 24 mpi. A 30 mpi, l'échappement viral est total. La mutation de l'histidine en position 330 a été montrée comme très délétère pour la neutralisation par la lignée A. Cependant au cours de l'évolution du virus autologue, la mutation de cette position ne se produit qu'en dernière phase d'échappement à 30 mpi et ne suffit pas à l'expliquer. La plupart des modifications dans la boucle V3 ainsi que la perte du glycane N295 et N332 sont également plus tardives que l'échappement viral de la lignée A. La région C3 connaît une évolution plus importante entre 12 et 30 mpi, mais aucune mutation ne permet d'un point de vue théorique, de comprendre le phénotype d'échappement de la lignée A. C'est-à-dire que si une mutation est corrélée à une absence de neutralisation pour certains variants, il y a de trop nombreux contre-exemples de variants portant la même mutation et étant neutralisés. Inversement, des variants d'échappement ne portent aucune mutation à ces positions, ce qui signifie que d'autres évènements expliquent la perte de neutralisation. La fin de la boucle V4 et la région C4 ont été identifiées par criblage alanine sur JRCSF, comme jouant un rôle pour la neutralisation par V60-3A. La boucle V4 subit une évolution intense avec plusieurs événements de délétions entre 3 et 8 acides aminés se produisant à partir de 18 mpi. Pourtant, elles ne s'accordent pas au phénotype d'échappement. De plus, les positions entre 415 et 456 identifiées comme les plus importantes sont extrêmement conservées tout au long de l'évolution. Les voies d'échappement précédemment décrites pour des lignées N332, comme la mutation des positions 328 et l'apparition d'un glycane N335 chez PC76, ne semblent pas non plus s'opérer dans la coévolution chez ce donneur.

La lignée B, qui semble induite plus tard que la lignée A, perd aussi sa neutralisation autologue plus tardivement avec l'apparition de variants d'échappement à partir de 36 mpi et l'échappement total à 54 mpi. La mutation occasionnelle du glycane N332 chez un clone de 18 mpi explique son échappement pour la neutralisation de la lignée A. En revanche, la lignée B ne perd pas sa neutralisation sur ce variant. Au contraire, les IC50 sont même réduites pour quelques anticorps de la lignée B sur ce variant et deux variants de 30 mpi ayant muté le glycane N332. Cette analyse de l'évolution du virus autologue confirme les données de cartographie qui montraient que des anticorps de la lignée B tolèrent bien l'absence de glycanes. Leur perte au cours de l'évolution virale ne nous permettra donc pas d'expliquer l'échappement viral. La cartographie de l'épitope est par ailleurs assez incomplète, entre autres parce que l'absence de neutralisation de JRCSF, le seul virus pour lequel nous possédons une libraire complète de mutations, a empêché le recours au criblage alanine. Seuls quelques résidus dont les positions 300 et 325 et les résidus du motif GDIR ont été montrés comme importants pour la neutralisation. La mutation N300H apparaît à 36 mpi de façon concomitante avec l'apparition de variants résistants à la neutralisation par la lignée B. La restauration d'une asparagine en position 325 à partir de 42 mpi pourrait participer à l'échappement viral pour la neutralisation par les anticorps de la lignée B. Mais ces deux mutations ne suffissent pas à expliquer l'intégralité du phénotype observé. En effet,

un variant de 42 mpi possèdent une histidine en position 300 et reste neutralisé par trois anticorps de la lignée. De même, l'échappement total d'un virus de 42 mpi et d'un virus de 54 mpi ne peut pas être expliqué par ces mutations. Entre 18 et 30 mpi, la boucle V1 reste assez constante et fait 23 à 27 acides aminés. Puis sa longueur est modifiée par la duplication d'une petite séquence de plus ou moins 5 acides aminés en amont du résidu 146. Un impact de la longueur de la boucle V1 pour l'échappement viral contre des anticorps ciblant la région N332 a déjà été montré *(Deshpande, Retrovirology, 2016 ; van den Kerkhof, Retrovirology, 2016).* Nous disposons de trop peu de clones entre 36 et 54 mpi pour confirmer un impact de la longueur de la boucle V1 dans le cas de l'échappement viral de la lignée B.

L'échappement viral pour les lignées A et B n'est donc pas encore élucidé. Pour prouver le mécanisme d'échappement, il faut qu'une mutation (ou plusieurs) abolisse la neutralisation d'un variant neutralisé proche du point d'échappement et que la mutation inverse sur un variant d'échappement restaure la neutralisation. De nouveaux mutants devront être testés, notamment dans les régions citées ici. De plus, la combinaison de plusieurs évènements évolutifs pourrait expliquer le phénotype d'échappement.

▪ Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons isolé deux lignées d'anticorps à des moments tardifs de leur évolution chez un donneur infecté par un VIH de sous-type D. Elles ciblent le trimère d'enveloppe au niveau de la région N332 de différentes manières, avec une implication plus importante des glycanes riches en mannose pour la lignée A. Les anticorps isolés ne permettent pas d'expliquer l'intégralité de l'exceptionnelle largeur de spectre du donneur PC94 et ont une activité neutralisante hétérologue assez modeste en comparaison d'autres anticorps ciblant la région N332. Les lignées ont été induites l'une après l'autre et pourraient avoir bénéficié d'un effet coopératif de la pression de sélection sur le trimère d'enveloppe en profitant des mutations d'échappement induites par l'une et l'autre. Cependant, s'ils existent, nous n'avons pas encore décrypté ces mécanismes de coopération.

Afin d'expliquer l'intégralité de l'activité du sérum, nous devons isoler de nouveaux anticorps. De plus, l'isolement d'anticorps plus précoces des deux lignées permettrait une meilleure compréhension de l'évolution de ces lignées. L'isolement pourrait faire appel à la même stratégie de tri cellulaire en utilisant des gp120 recombinantes monomériques. Dans ce cas, les souches à utiliser devront être redéfinies puisqu'il est apparu que la mutation N332A sur le virus IAVIC22 ne produisait pas la baisse d'activité la plus marquée sur l'activité du sérum. Une autre technique récemment mise au point permet le séquençage nouvelle génération des couples de chaînes lourdes et légères. Elle permet d'isoler des anticorps monoclonaux tout en ayant accès à l'intégralité de l'arbre phylogénétique de la lignée d'anticorps. Alternativement, le séquençage nouvelle génération des chaînes lourdes donnerait une indication importante sur l'évolution de la lignée.

L'induction des lignées et l'échappement viral restent aussi à caractériser par la réalisation de tests de neutralisation supplémentaires sur pseudovirus portant des protéines d'enveloppe autologues mutées. La neutralisation des virus autologues par différents anticorps neutralisants à large spectre ciblant la région N332 (PGT121, PGT128, PGT135 etc.) pourrait aussi permettre de définir les éventuelles mutations d'échappement pour ces anticorps, ce qui pourrait aider la caractérisation de l'échappement autologue.

Parmi les expériences encore à réaliser, la liaison à un panel d'autoantigènes devra être testée par ELISA afin de connaître les éventuelles propriétés autoréactives ou polyréactives de ces anticorps. Enfin, l'étude structurale des anticorps et de leur interaction avec le trimère reste la plus à même d'élucider les caractéristiques uniques de ces lignées, notamment l'apparente préférence de ces anticorps pour la forme monomérique de la gp120.

V. CONCLUSION GENERALE

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de la recherche d'un vaccin contre le VIH, un objectif qui s'est révélé particulièrement difficile à atteindre. L'extrême diversité génétique du VIH et son fort taux de glycosylation imposent des défis, tant aux scientifiques qu'au système immunitaire soumis à l'infection. Les études sur les anticorps neutralisants à large spectre montrent que le système immunitaire est capable de prouesses dont on ignorait jusque-là l'existence, comme de très forts taux de mutations des immunoglobulines et une grande capacité d'adaptation à la modification de leurs épitopes. Le développement de nouvelles techniques, notamment pour l'isolement des anticorps monoclonaux humains, l'analyse à haut débit de leur activité neutralisante, le séquençage nouvelle génération et l'analyse des glycanes, ont ainsi levé le voile sur des mécanismes très complexes de coévolution entre une population virale en fuite perpétuelle et une population de lymphocytes B soumis au hasard et à la compétition. A défaut de comprendre l'intégralité des événements de dialogue entre ces deux parties, nous nous efforçons d'en décrypter les principales étapes. A ce titre, même si nos travaux apportent des éléments de réponse, ils restent inachevés, puisque nous n'avons pas encore identifié les protéines d'enveloppe responsables de l'induction, de la maturation et de l'échappement des lignées de PC94. Concernant le donneur PC76, la complexité des interactions anticorps-antigène a limité notre approche et nos résultats ne permettent pas de dire quelles mutations de l'anticorps permettent quels niveaux d'accroissement de la largeur de spectre. Par ailleurs, des expériences de résonance plasmonique de surface devront être menées pour tenter d'identifier le clone de protéine d'enveloppe ayant induit la lignée du donneur PC76. Le rôle de la nature des glycosylations dans cette interaction devra aussi être précisé.

Toutefois, nos résultats confirment la grande diversité de solutions qui existent pour la neutralisation à large spectre ciblant la région riche en mannose du trimère d'enveloppe. De plus, il apparaît qu'une même personne est capable de faire plusieurs lignées contre cette région. Ainsi, il semble qu'exposé à la bonne stimulation antigénique, la plupart des personnes soient capables de monter une réponse robuste contre cette région. Le défi doit maintenant être d'accélérer la maturation de ces réponses vers la reconnaissance hétérologue à large spectre. Une des stratégies vaccinales les plus innovantes est la mise au point de séries d'immunogènes qui sélectionneraient et entraîneraient la maturation des lymphocytes de lignées à large spectre, dans une durée compatible avec un protocole d'immunisation. Pour ce faire, le recours à l'étude du développement des réponses anticorps durant l'infection naturelle, telle que nous l'avons décrite, est essentiel pour l'identification des anticorps et des immunogènes les plus adéquats pour une approche vaccinale rationnelle réussie.

Bibliographie

Abbott, R.K., Lee, J.H., Menis, S., Skog, P., Rossi, M., Ota, T., Kulp, D.W., Bhullar, D., Kalyuzhniy, O., Havenar-Daughton, C., et al. (2018). Precursor Frequency and Affinity Determine B Cell Competitive Fitness in Germinal Centers, Tested with Germline-Targeting HIV Vaccine Immunogens. Immunity *48*, 133-146.e6.

Andrabi, R., Voss, J.E., Liang, C.-H., Briney, B., McCoy, L.E., Wu, C.-Y., Wong, C.-H., Poignard, P., and Burton, D.R. (2015). Identification of common features in prototype broadly neutralizing antibodies to HIV envelope V2 apex to facilitate vaccine design. Immunity *43*, 959–973.

Anthony, C., York, T., Bekker, V., Matten, D., Selhorst, P., Ferreria, R.-C., Garrett, N.J., Karim, S.S.A., Morris, L., Wood, N.T., et al. (2017). Cooperation between Strain-Specific and Broadly Neutralizing Responses Limited Viral Escape and Prolonged the Exposure of the Broadly Neutralizing Epitope. J. Virol. *91*.

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

Bachmann, M.F., and Zinkernagel, R.M. (1996). The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. Immunol. Today *17*, 553–558.

Bailey, J.R., Lassen, K.G., Yang, H.-C., Quinn, T.C., Ray, S.C., Blankson, J.N., and Siliciano, R.F. (2006). Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. J. Virol. *80*, 4758–4770.

Bar, K.J., Sneller, M.C., Harrison, L.J., Justement, J.S., Overton, E.T., Petrone, M.E., Salantes, D.B., Seamon, C.A., Scheinfeld, B., Kwan, R.W., et al. (2016). Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption. N. Engl. J. Med. *375*, 2037–2050.

Barnes, C.O., Gristick, H.B., Freund, N.T., Escolano, A., Lyubimov, A.Y., Hartweger, H., West, A.P., Cohen, A.E., Nussenzweig, M.C., and Bjorkman, P.J. (2018). Structural characterization of a highly-potent V3-glycan broadly neutralizing antibody bound to natively-glycosylated HIV-1 envelope. Nature Communications *9*.

Barouch, D.H., Whitney, J.B., Moldt, B., Klein, F., Oliveira, T.Y., Liu, J., Stephenson, K.E., Chang, H.-W., Shekhar, K., Gupta, S., et al. (2013). Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. Nature *503*, 224–228.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science *220*, 868–871.

Behrens, A.-J., and Crispin, M. (2017). Structural principles controlling HIV envelope glycosylation. Current Opinion in Structural Biology *44*, 125–133.

Behrens, A.-J., Vasiljevic, S., Pritchard, L.K., Harvey, D.J., Andev, R.S., Krumm, S.A., Struwe, W.B., Cupo, A., Kumar, A., Zitzmann, N., et al. (2016). Composition and Antigenic Effects of Individual Glycan Sites of a Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein. Cell Reports *14*, 2695–2706.

Behrens, A.-J., Struwe, W.B., and Crispin, M. (2017). Glycosylation profiling to evaluate glycoprotein immunogens against HIV-1. Expert Rev Proteomics *14*, 881–890.

Bhiman, J.N., Anthony, C., Doria-Rose, N.A., Karimanzira, O., Schramm, C.A., Khoza, T., Kitchin, D., Botha, G., Gorman, J., Garrett, N.J., et al. (2015). Viral variants that initiate and drive maturation of V1V2-directed HIV-1 broadly neutralizing antibodies. Nat. Med. *21*, 1332–1336.

Binley, J.M., Lybarger, E.A., Crooks, E.T., Seaman, M.S., Gray, E., Davis, K.L., Decker, J.M., Wycuff, D., Harris, L., Hawkins, N., et al. (2008). Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C. J. Virol. *82*, 11651–11668.

Blaak, H., van't Wout, A.B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E., and Schuitemaker, H. (2000). In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 1269–1274.

Blattner, C., Lee, J.H., Sliepen, K., Derking, R., Falkowska, E., de la Peña, A.T., Cupo, A., Julien, J.-P., van Gils, M., Lee, P.S., et al. (2014). Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 Env trimers. Immunity *40*, 669–680.

Bonsignori, M., Hwang, K.-K., Chen, X., Tsao, C.-Y., Morris, L., Gray, E., Marshall, D.J., Crump, J.A., Kapiga, S.H., Sam, N.E., et al. (2011). Analysis of a Clonal Lineage of HIV-1 Envelope V2/V3 Conformational Epitope-Specific Broadly Neutralizing Antibodies and Their Inferred Unmutated Common Ancestors ▽. J Virol *85*, 9998–10009.

Bonsignori, M., Kreider, E.F., Fera, D., Meyerhoff, R.R., Bradley, T., Wiehe, K., Alam, S.M., Aussedat, B., Walkowicz, W.E., Hwang, K.-K., et al. (2017). Staged induction of HIV-1 glycan-dependent broadly neutralizing antibodies. Sci Transl Med *9*.

Bouvin-Pley, M., Morgand, M., Meyer, L., Goujard, C., Moreau, A., Mouquet, H., Nussenzweig, M., Pace, C., Ho, D., Bjorkman, P.J., et al. (2014). Drift of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 toward increased neutralization resistance over the course of the epidemic: a comprehensive study using the most potent and broadly neutralizing monoclonal antibodies. J. Virol. *88*, 13910–13917.

Bouvin-Pley, M., Morgand, M., Moreau, A., Jestin, P., Simonnet, C., Tran, L., Goujard, C., Meyer, L., Barin, F., and Braibant, M. (2013). Evidence for a Continuous Drift of the HIV-1 Species towards Higher Resistance to Neutralizing Antibodies over the Course of the Epidemic. PLOS Pathogens 9, e1003477.

Bracq, L., Xie, M., Benichou, S., and Bouchet, J. (2018). Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1. Front Immunol *9*, 260.

Braden, B.C., Goldman, E.R., Mariuzza, R.A., and Poljak, R.J. (1998). Anatomy of an antibody molecule: structure, kinetics, thermodynamics and mutational studies of the antilysozyme antibody D1.3. Immunol. Rev. *163*, 45–57.

Brandenberg, O.F., Magnus, C., Rusert, P., Regoes, R.R., and Trkola, A. (2015). Different Infectivity of HIV-1 Strains Is Linked to Number of Envelope Trimers Required for Entry. PLoS Pathogens *11*, e1004595.

Brehm, M.A., Cuthbert, A., Yang, C., Miller, D.M., DiIorio, P., Laning, J., Burzenski, L., Gott, B., Foreman, O., Kavirayani, A., et al. (2010). Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: Analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rγnull mutation. Clinical Immunology *135*, 84–98.

Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat. Med. *12*, 1365–1371.

Briney, B.S., Willis, J.R., and Crowe, J.E. (2012a). Location and length distribution of somatic hypermutation-associated DNA insertions and deletions reveals regions of antibody structural plasticity. Genes & Immunity *13*, 523–529.

Briney, B.S., Willis, J.R., and Crowe, J.E. (2012b). Human Peripheral Blood Antibodies with Long HCDR3s Are Established Primarily at Original Recombination Using a Limited Subset of Germline Genes. PLoS ONE *7*, e36750.

Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Amraoui, S., Malbec, M., Richard, L., Bourdic, K., Donahue, D.A., Lorin, V., Casartelli, N., Noël, N., et al. (2016). Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. Nature Communications *7*, 10844.

Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, W., Trkola, A., Purtscher, M., Gruber, G., Tauer, C., Steindl, F., and Jungbauer, A. (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.

Buchbinder, S.P., Mehrotra, D.V., Duerr, A., Fitzgerald, D.W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P.B., Lama, J.R., Marmor, M., Del Rio, C., et al. (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. Lancet *372*, 1881–1893.

Burleigh, L., Lozach, P.-Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2006). Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. J. Virol. *80*, 2949–2957.

Burton, D.R., and Hangartner, L. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. Annual Review of Immunology *34*, 635–659.

Cai, Y., Karaca-Griffin, S., Chen, J., Tian, S., Fredette, N., Linton, C.E., Rits-Volloch, S., Lu, J., Wagh, K., Theiler, J., et al. (2017). Antigenicity-defined conformations of an extremely neutralization-resistant HIV-1 envelope spike. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *114*, 4477–4482.

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

Calarese, D.A., Lee, H.-K., Huang, C.-Y., Best, M.D., Astronomo, R.D., Stanfield, R.L., Katinger, H., Burton, D.R., Wong, C.-H., and Wilson, I.A. (2005). Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 13372–13377.

Cao, L., Diedrich, J.K., Kulp, D.W., Pauthner, M., He, L., Park, S.-K.R., Sok, D., Su, C.Y., Delahunty, C.M., Menis, S., et al. (2017). Global site-specific N-glycosylation analysis of HIV envelope glycoprotein. Nature Communications *8*, 14954.

Cao, L., Diedrich, J.K., Ma, Y., Wang, N., Pauthner, M., Park, S.-K.R., Delahunty, C.M., McLellan, J.S., Burton, D.R., Yates, J.R., et al. (2018). Global site-specific analysis of glycoprotein N-glycan processing. Nature Protocols *13*, 1196–1212.

Carlson, J.M., Schaefer, M., Monaco, D.C., Batorsky, R., Claiborne, D.T., Prince, J., Deymier, M.J., Ende, Z.S., Klatt, N.R., DeZiel, C.E., et al. (2014). HIV transmission. Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck. Science *345*, 1254031.

Carnec, X., Zaïdi, S., and Amara, A. (2007). Mécanismes moléculaires de l'entrée du VIH dans les cellules cibles. Virologie *11*, 86–94.

Caskey, M., Klein, F., Lorenzi, J.C.C., Seaman, M.S., West, A.P., Buckley, N., Kremer, G., Nogueira, L., Braunschweig, M., Scheid, J.F., et al. (2015). Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. Nature *522*, 487–491.

Caskey, M., Schoofs, T., Gruell, H., Settler, A., Karagounis, T., Kreider, E.F., Murrell, B., Pfeifer, N., Nogueira, L., Oliveira, T.Y., et al. (2017). Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. Nat. Med. *23*, 185–191.

Chen, Z., and Wang, J.H. (2014). Generation and repair of AID-initiated DNA lesions in B lymphocytes. Front Med *8*, 201–216.

Chen, Y., Zhang, J., Hwang, K.-K., Bouton-Verville, H., Xia, S.-M., Newman, A., Ouyang, Y.-B., Haynes, B.F., and Verkoczy, L. (2013). Common tolerance mechanisms, but distinct cross-reactivities associated with gp41 and lipids, limit production of HIV-1 broad neutralizing antibodies 2F5 and 4E10. J. Immunol. *191*, 1260–1275.

Cheng, C., Pancera, M., Bossert, A., Schmidt, S.D., Chen, R.E., Chen, X., Druz, A., Narpala, S., Doria-Rose, N.A., McDermott, A.B., et al. (2015). Immunogenicity of a Prefusion HIV-1 Envelope Trimer in Complex with a Quaternary-Structure-Specific Antibody. J. Virol. *90*, 2740–2755.

Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature *387*, 183–188.

Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *95*, 8869–8873.

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., and Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science *233*, 343–346.

Cohen, K., Altfeld, M., Alter, G., and Stamatatos, L. (2014). Early preservation of CXCR5+ PD-1+ helper T cells and B cell activation predict the breadth of neutralizing antibody responses in chronic HIV-1 infection. J. Virol. *88*, 13310–13321.

Cohen, Y.Z., Lorenzi, J.C.C., Seaman, M.S., Nogueira, L., Schoofs, T., Krassnig, L., Butler, A., Millard, K., Fitzsimons, T., Daniell, X., et al. (2017). Neutralizing Activity of Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Antibodies against Clade B Clinical Isolates Produced in Peripheral Blood Mononuclear Cells. Journal of Virology *92*.

Crispin, M., Ward, A.B., and Wilson, I.A. (2018). Structure and Immune Recognition of the HIV Glycan Shield. Annual Review of Biophysics *47*, 499–523.

Crooks, E.T., Tong, T., Osawa, K., and Binley, J.M. (2011). Enzyme Digests Eliminate Nonfunctional Env from HIV-1 Particle Surfaces, Leaving Native Env Trimers Intact and Viral Infectivity Unaffected. Journal of Virology *85*, 5825–5839.

Crowe, J.E. (2017). Principles of Broad and Potent Antiviral Human Antibodies: Insights for Vaccine Design. Cell Host & Microbe *22*, 193–206.

Dal Porto, J.M., Haberman, A.M., Kelsoe, G., and Shlomchik, M.J. (2002). Very Low Affinity B Cells Form Germinal Centers, Become Memory B Cells, and Participate in Secondary Immune Responses When Higher Affinity Competition Is Reduced. The Journal of Experimental Medicine *195*, 1215–1221.

Davenport, T.M., Gorman, J., Joyce, M.G., Zhou, T., Soto, C., Guttman, M., Moquin, S., Yang, Y., Zhang, B., Doria-Rose, N.A., et al. (2016). Somatic Hypermutation-Induced Changes in the Structure and Dynamics of HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies. Structure *24*, 1346–1357.

deCamp, A., Hraber, P., Bailer, R.T., Seaman, M.S., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Gottardo, R., Edlefsen, P., Self, S., Tang, H., et al. (2014). Global Panel of HIV-1 Env Reference Strains for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. Journal of Virology *88*, 2489–2507.

Deshpande, S., Patil, S., Kumar, R., Hermanus, T., Murugavel, K.G., Srikrishnan, A.K., Solomon, S., Morris, L., and Bhattacharya, J. (2016). HIV-1 clade C escapes broadly neutralizing autologous antibodies with N332 glycan specificity by distinct mechanisms. Retrovirology *13*.

Desrosiers, R.C. (2017). Protection against HIV Acquisition in the RV144 Trial. J. Virol. 91.

Doores, K.J., and Burton, D.R. (2010). Variable Loop Glycan Dependency of the Broad and Potent HIV-1-Neutralizing Antibodies PG9 and PG16. Journal of Virology *84*, 10510–10521.

Doores, K.J., Bonomelli, C., Harvey, D.J., Vasiljevic, S., Dwek, R.A., Burton, D.R., Crispin, M., and Scanlan, C.N. (2010). Envelope glycans of immunodeficiency virions are almost entirely oligomannose antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 13800–13805.

Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Daniels, M.G., O'Dell, S., Nason, M., Lapedes, A., Bhattacharya, T., Migueles, S.A., Wyatt, R.T., Korber, B.T., et al. (2010). Breadth of Human Immunodeficiency Virus-Specific Neutralizing Activity in Sera: Clustering Analysis and Association with Clinical Variables. J Virol *84*, 1631–1636.

Doria-Rose, N.A., Schramm, C.A., Gorman, J., Moore, P.L., Bhiman, J.N., DeKosky, B.J., Ernandes, M.J., Georgiev, I.S., Kim, H.J., Pancera, M., et al. (2014). Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies. Nature *509*, 55–62.

Dosenovic, P., von Boehmer, L., Escolano, A., Jardine, J., Freund, N.T., Gitlin, A.D., McGuire, A.T., Kulp, D.W., Oliveira, T., Scharf, L., et al. (2015). Immunization for HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies in Human Ig Knock-In Mice. Cell *161*, 1505–1515.

Douek, D.C., Picker, L.J., and Koup, R.A. (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. Annu. Rev. Immunol. *21*, 265–304.

Edelman, G.M. (1991). Antibody structure and molecular immunology. Scand. J. Immunol. *34*, 1–22.

Eggink, D., Melchers, M., Wuhrer, M., van Montfort, T., Dey, A.K., Naaijkens, B.A., David, K.B., Le Douce, V., Deelder, A.M., Kang, K., et al. (2010). Lack of complex N-glycans on HIV-1 envelope glycoproteins preserves protein conformation and entry function. Virology *401*, 236–247.

Engelman, A.N., and Singh, P.K. (2018). Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. Cell. Mol. Life Sci. *75*, 2491–2507.

Escolano, A., Steichen, J.M., Dosenovic, P., Kulp, D.W., Golijanin, J., Sok, D., Freund, N.T., Gitlin, A.D., Oliveira, T., Araki, T., et al. (2016). Sequential Immunization Elicits Broadly Neutralizing anti-HIV-1 Antibodies in Ig Knock-in Mice. Cell *166*, 1445-1458.e12.

Falkowska, E., Le, K.M., Ramos, A., Doores, K.J., Lee, J.H., Blattner, C., Ramirez, A., Derking, R., van Gils, M.J., Liang, C.-H., et al. (2014). Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. Immunity *40*, 657–668.

Fera, D., Schmidt, A.G., Haynes, B.F., Gao, F., Liao, H.-X., Kepler, T.B., and Harrison, S.C. (2014). Affinity maturation in an HIV broadly neutralizing B-cell lineage through reorientation of variable domains. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 10275–10280.

Fera, D., Lee, M.S., Wiehe, K., Meyerhoff, R.R., Piai, A., Bonsignori, M., Aussedat, B., Walkowicz, W.E., Ton, T., Zhou, J.O., et al. (2018). HIV envelope V3 region mimic embodies key features of a broadly neutralizing antibody lineage epitope. Nat Commun *9*, 1111.

Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science *278*, 1295–1300.

Flynn, N.M., Forthal, D.N., Harro, C.D., Judson, F.N., Mayer, K.H., Para, M.F., and rgp120 HIV Vaccine Study Group (2005). Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. J. Infect. Dis. *191*, 654–665.

Freund, N.T., Wang, H., Scharf, L., Nogueira, L., Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Golijanin, J., Sievers, S.A., Sok, D., Cai, H., et al. (2017). Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller. Science Translational Medicine *9*, eaal2144.

Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. Annu. Rev. Immunol. *18*, 495–527.

Gao, F., Bonsignori, M., Liao, H.-X., Kumar, A., Xia, S.-M., Lu, X., Cai, F., Hwang, K.-K., Song, H., Zhou, T., et al. (2014). Cooperation of B Cell Lineages in Induction of HIV-1-Broadly Neutralizing Antibodies. Cell *158*, 481–491.

Gao, Y., McKay, P., and Mann, J. (2018). Advances in HIV-1 Vaccine Development. Viruses *10*, 167.

Garces, F., Sok, D., Kong, L., McBride, R., Kim, H.J., Saye-Francisco, K.F., Julien, J.-P., Hua, Y., Cupo, A., Moore, J.P., et al. (2014). Structural evolution of glycan recognition by a family of potent HIV antibodies. Cell *159*, 69–79.

Garces, F., Lee, J.H., de Val, N., de la Pena, A.T., Kong, L., Puchades, C., Hua, Y., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Moore, J.P., et al. (2015). Affinity Maturation of a Potent Family of HIV Antibodies Is Primarily Focused on Accommodating or Avoiding Glycans. Immunity *43*, 1053–1063.

Gauss, G.H., and Lieber, M.R. (1996). Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. Mol. Cell. Biol. *16*, 258–269.

Gautam, R., Nishimura, Y., Pegu, A., Nason, M.C., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Buckler-White, A., Sadjadpour, R., Wang, K., et al. (2016). A SINGLE INJECTION OF ANTI-HIV-1 ANTIBODIES PROTECTS AGAINST REPEATED SHIV CHALLENGES. Nature *533*, 105–109.

Gilbert, P., Wang, M., Wrin, T., Petropoulos, C., Gurwith, M., Sinangil, F., D'Souza, P., Rodriguez-Chavez, I.R., DeCamp, A., Giganti, M., et al. (2010). Magnitude and breadth of a nonprotective neutralizing antibody response in an efficacy trial of a candidate HIV-1 gp120 vaccine. J. Infect. Dis. *202*, 595–605.

Gilbert, P.B., Huang, Y., and Janes, H.E. (2016). Modeling HIV vaccine trials of the future: Current Opinion in HIV and AIDS *11*, 620–627.

Giudicelli, V., Brochet, X., and Lefranc, M.-P. (2011). IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences. Cold Spring Harb Protoc *2011*, 695–715.

Goo, L., Chohan, V., Nduati, R., and Overbaugh, J. (2014). Early development of broadly neutralizing antibodies in HIV-1-infected infants. Nat. Med. *20*, 655–658.

Gorman, J., Soto, C., Yang, M.M., Davenport, T.M., Guttman, M., Bailer, R.T., Chambers, M., Chuang, G.-Y., DeKosky, B.J., Doria-Rose, N.A., et al. (2016). Structures of HIV-1 Env V1V2 with broadly neutralizing antibodies reveal commonalities that enable vaccine design. Nat. Struct. Mol. Biol. *23*, 81–90.

Gray, E.S., Taylor, N., Wycuff, D., Moore, P.L., Tomaras, G.D., Wibmer, C.K., Puren, A., DeCamp, A., Gilbert, P.B., Wood, B., et al. (2009). Antibody specificities associated with neutralization breadth in plasma from human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected blood donors. J. Virol. *83*, 8925–8937.

Gristick, H.B., von Boehmer, L., West, A.P., Schamber, M., Gazumyan, A., Golijanin, J., Seaman, M.S., Fätkenheuer, G., Klein, F., Nussenzweig, M.C., et al. (2016). Natively glycosylated HIV-1 Env structure reveals new mode for antibody recognition of the CD4-binding site. Nat. Struct. Mol. Biol. *23*, 906–915.

Guenaga, J., Dubrovskaya, V., de Val, N., Sharma, S.K., Carrette, B., Ward, A.B., and Wyatt, R.T. (2015). Structure-Guided Redesign Increases the Propensity of HIV Env To Generate Highly Stable Soluble Trimers. J. Virol. *90*, 2806–2817.

Gulbranson-Judge, A., and MacLennan, I. (1996). Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c. Eur. J. Immunol. *26*, 1830–1837.

Guttman, M., Garcia, N.K., Cupo, A., Matsui, T., Julien, J.-P., Sanders, R.W., Wilson, I.A., Moore, J.P., and Lee, K.K. (2014). CD4-induced activation in a soluble HIV-1 Env trimer. Structure *22*, 974–984.

Haji-Ghassemi, O., Blackler, R.J., Martin Young, N., and Evans, S.V. (2015). Antibody recognition of carbohydrate epitopes†. Glycobiology *25*, 920–952.

Halper-Stromberg, A., Lu, C.-L., Klein, F., Horwitz, J.A., Bournazos, S., Nogueira, L., Eisenreich, T.R., Liu, C., Gazumyan, A., Schaefer, U., et al. (2014). Broadly neutralizing antibodies and viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. Cell *158*, 989–999.

Hammer, S.M., Sobieszczyk, M.E., Janes, H., Karuna, S.T., Mulligan, M.J., Grove, D., Koblin, B.A., Buchbinder, S.P., Keefer, M.C., Tomaras, G.D., et al. (2013). Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. N. Engl. J. Med. *369*, 2083–2092.

Harris, A., Borgnia, M.J., Shi, D., Bartesaghi, A., He, H., Pejchal, R., Kang, Y.K., Depetris, R., Marozsan, A.J., Sanders, R.W., et al. (2011). Trimeric HIV-1 glycoprotein gp140 immunogens and native HIV-1 envelope glycoproteins display the same closed and open quaternary molecular architectures. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 11440–11445.

Havenar-Daughton, C., Carnathan, D.G., Torrents de la Peña, A., Pauthner, M., Briney, B., Reiss, S.M., Wood, J.S., Kaushik, K., van Gils, M.J., Rosales, S., et al. (2016). Direct probing of germinal center responses reveals immunological features and bottlenecks for neutralizing antibody responses to HIV Env trimer. Cell Rep *17*, 2195–2209.

Havenar-Daughton, C., Abbott, R.K., Schief, W.R., and Crotty, S. (2018). When designing vaccines, consider the starting material: the human B cell repertoire. Curr. Opin. Immunol. *53*, 209–216.

Haynes, B.F., Fleming, J., St Clair, E.W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scearce, R.M., Plonk, K., Staats, H.F., et al. (2005). Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. Science *308*, 1906–1908.

Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., et al. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. N. Engl. J. Med. *366*, 1275–1286.

Hessell, A.J., Poignard, P., Hunter, M., Hangartner, L., Tehrani, D.M., Bleeker, W.K., Parren, P.W.H.I., Marx, P.A., and Burton, D.R. (2009a). Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. Nat. Med. *15*, 951–954.

Hessell, A.J., Rakasz, E.G., Poignard, P., Hangartner, L., Landucci, G., Forthal, D.N., Koff, W.C., Watkins, D.I., and Burton, D.R. (2009b). Broadly Neutralizing Human Anti-HIV Antibody 2G12 Is Effective in Protection against Mucosal SHIV Challenge Even at Low Serum Neutralizing Titers. PLoS Pathog *5*.

Hessell, A.J., Jaworski, J.P., Epson, E., Matsuda, K., Pandey, S., Kahl, C., Reed, J., Sutton, W.F., Hammond, K.B., Cheever, T.A., et al. (2016a). Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques. Nat. Med. *22*, 362–368.

Hessell, A.J., Malherbe, D.C., Pissani, F., McBurney, S., Krebs, S.J., Gomes, M., Pandey, S., Sutton, W.F., Burwitz, B.J., Gray, M., et al. (2016b). Achieving Potent Autologous Neutralizing Antibody Responses against Tier 2 HIV-1 Viruses by Strategic Selection of Envelope Immunogens. J. Immunol. *196*, 3064–3078.

Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature *373*, 123–126.

Horwitz, J.A., Halper-Stromberg, A., Mouquet, H., Gitlin, A.D., Tretiakova, A., Eisenreich, T.R., Malbec, M., Gravemann, S., Billerbeck, E., Dorner, M., et al. (2013). HIV-1 suppression and durable control by combining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs in humanized mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, 16538–16543.

Hraber, P., Seaman, M.S., Bailer, R.T., Mascola, J.R., Montefiori, D.C., and Korber, B.T. (2014). Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection. AIDS *28*, 163–169.

Hsu, D.C., and O'Connell, R.J. (2017). Progress in HIV vaccine development. Human Vaccines & Immunotherapeutics *13*, 1018–1030.

Huang, J., Kang, B.H., Pancera, M., Lee, J.H., Tong, T., Feng, Y., Imamichi, H., Georgiev, I.S., Chuang, G.-Y., Druz, A., et al. (2014). Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. Nature *515*, 138–142.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. Nature *354*, 389–392.

Jardine, J.G., Kulp, D.W., Havenar-Daughton, C., Sarkar, A., Briney, B., Sok, D., Sesterhenn, F., Ereño-Orbea, J., Kalyuzhniy, O., Deresa, I., et al. (2016). HIV-1 broadly neutralizing antibody precursor B cells revealed by germline-targeting immunogen. Science *351*, 1458–1463.

Javaherian, K., Langlois, A.J., McDanal, C., Ross, K.L., Eckler, L.I., Jellis, C.L., Profy, A.T., Rusche, J.R., Bolognesi, D.P., and Putney, S.D. (1989). Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. Proceedings of the National Academy of Sciences *86*, 6768–6772.

Jimenez, R., Salazar, G., Yin, J., Joo, T., and Romesberg, F.E. (2004). Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 3803–3808.

Julien, J.-P., Cupo, A., Sok, D., Stanfield, R.L., Lyumkis, D., Deller, M.C., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., et al. (2013a). Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. Science *342*, 1477–1483.

Julien, J.-P., Sok, D., Khayat, R., Lee, J.H., Doores, K.J., Walker, L.M., Ramos, A., Diwanji, D.C., Pejchal, R., Cupo, A., et al. (2013b). Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. PLoS Pathog. *9*, e1003342.

Julien, J.-P., Lee, J.H., Ozorowski, G., Hua, Y., Torrents de la Peña, A., de Taeye, S.W., Nieusma, T., Cupo, A., Yasmeen, A., Golabek, M., et al. (2015). Design and structure of two HIV-1 clade C SOSIP.664 trimers that increase the arsenal of native-like Env immunogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *112*, 11947–11952.

Kahn, J.O., and Walker, B.D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. N. Engl. J. Med. *339*, 33–39.

Kahn, J.O., Cherng, D.W., Mayer, K., Murray, H., and Lagakos, S. (2000). Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10(6)/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial. JAMA *284*, 2193–2202.

Kepler, T.B., Liao, H.-X., Alam, S.M., Bhaskarabhatla, R., Zhang, R., Yandava, C., Stewart, S., Anasti, K., Kelsoe, G., Parks, R., et al. (2014). Immunoglobulin Gene Insertions and Deletions in the Affinity Maturation of HIV-1 Broadly Reactive Neutralizing Antibodies. Cell Host & Microbe *16*, 304–313.

van den Kerkhof, T.L.G.M., de Taeye, S.W., Boeser-Nunnink, B.D., Burton, D.R., Kootstra, N.A., Schuitemaker, H., Sanders, R.W., and van Gils, M.J. (2016). HIV-1 escapes from N332-directed antibody neutralization in an elite neutralizer by envelope glycoprotein elongation and introduction of unusual disulfide bonds. Retrovirology *13*.

Klasse, P.J., LaBranche, C.C., Ketas, T.J., Ozorowski, G., Cupo, A., Pugach, P., Ringe, R.P., Golabek, M., van Gils, M.J., Guttman, M., et al. (2016). Sequential and Simultaneous Immunization of Rabbits with HIV-1 Envelope Glycoprotein SOSIP.664 Trimers from Clades A, B and C. PLoS Pathog. *12*, e1005864.

Klasse, P.J., Ketas, T.J., Cottrell, C.A., Ozorowski, G., Debnath, G., Camara, D., Francomano, E., Pugach, P., Ringe, R.P., LaBranche, C.C., et al. (2018). Epitopes for neutralizing antibodies induced by HIV-1 envelope glycoprotein BG505 SOSIP trimers in rabbits and macaques. PLoS Pathog *14*.

Klein, J.S., and Bjorkman, P.J. (2010). Few and Far Between: How HIV May Be Evading Antibody Avidity. PLOS Pathogens *6*, e1000908.

Klein, F., Halper-Stromberg, A., Horwitz, J.A., Gruell, H., Scheid, J.F., Bournazos, S., Mouquet, H., Spatz, L.A., Diskin, R., Abadir, A., et al. (2012). HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. Nature *492*, 118–122.

Kong, L., Lee, J.H., Doores, K.J., Murin, C.D., Julien, J.-P., McBride, R., Liu, Y., Marozsan, A., Cupo, A., Klasse, P.-J., et al. (2013). Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. Nat. Struct. Mol. Biol. *20*, 796–803.

Kong, L., He, L., de Val, N., Vora, N., Morris, C.D., Azadnia, P., Sok, D., Zhou, B., Burton, D.R., Ward, A.B., et al. (2016). Uncleaved prefusion-optimized gp140 trimers derived from analysis of HIV-1 envelope metastability. Nat Commun *7*.

Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., and Detours, V. (2001). Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. British Medical Bulletin *58*, 19–42.

Krumm, S.A., Mohammed, H., Le, K.M., Crispin, M., Wrin, T., Poignard, P., Burton, D.R., and Doores, K.J. (2016). Mechanisms of escape from the PGT128 family of anti-HIV broadly neutralizing antibodies. Retrovirology *13*.

Kwon, Y.D., Pancera, M., Acharya, P., Georgiev, I.S., Crooks, E.T., Gorman, J., Joyce, M.G., Guttman, M., Ma, X., Narpala, S., et al. (2015). Crystal structure, conformational fixation and entry-related interactions of mature ligand-free HIV-1 Env. Nat. Struct. Mol. Biol. *22*, 522–531.

Kwong, P.D., and Mascola, J.R. (2018). HIV-1 Vaccines Based on Antibody Identification, B Cell Ontogeny, and Epitope Structure. Immunity *48*, 855–871.

Lai, R.P.J., Hock, M., Radzimanowski, J., Tonks, P., Hulsik, D.L., Effantin, G., Seilly, D.J., Dreja, H., Kliche, A., Wagner, R., et al. (2014). A Fusion Intermediate gp41 Immunogen Elicits Neutralizing Antibodies to HIV-1. Journal of Biological Chemistry *289*, 29912–29926.

Landais, E., and Moore, P.L. (2018). Development of broadly neutralizing antibodies in HIV-1 infected elite neutralizers. Retrovirology *15*, 61.

Landais, E., Huang, X., Havenar-Daughton, C., Murrell, B., Price, M.A., Wickramasinghe, L., Ramos, A., Bian, C.B., Simek, M., Allen, S., et al. (2016). Broadly Neutralizing Antibody Responses in a Large Longitudinal Sub-Saharan HIV Primary Infection Cohort. PLOS Pathogens *12*, e1005369.

Landais, E., Murrell, B., Briney, B., Murrell, S., Rantalainen, K., Berndsen, Z.T., Ramos, A., Wickramasinghe, L., Smith, M.L., Eren, K., et al. (2017). HIV Envelope Glycoform Heterogeneity and Localized Diversity Govern the Initiation and Maturation of a V2 Apex Broadly Neutralizing Antibody Lineage. Immunity *47*, 990-1003.e9.

Ledgerwood, J.E., Coates, E.E., Yamshchikov, G., Saunders, J.G., Holman, L., Enama, M.E., DeZure, A., Lynch, R.M., Gordon, I., Plummer, S., et al. (2015). Safety, pharmacokinetics and neutralization of the broadly neutralizing HIV-1 human monoclonal antibody VRC01 in healthy adults. Clin. Exp. Immunol. *182*, 289–301.

Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. Nucleic Acids Res. *37*, D1006-1012.

Liao, H., Guo, J., Lange, M.D., Fan, R., Zemlin, M., Su, K., Guan, Y., and Zhang, Z. (2013a). Contribution of V(H) replacement products to the generation of anti-HIV antibodies. Clin. Immunol. *146*, 46–55.

Liao, H.-X., Bonsignori, M., Alam, S.M., McLellan, J.S., Tomaras, G.D., Moody, M.A., Kozink, D.M., Hwang, K.-K., Chen, X., Tsao, C.-Y., et al. (2013b). Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. Immunity *38*, 176–186.

Liao, H.-X., Lynch, R., Zhou, T., Gao, F., Alam, S.M., Boyd, S.D., Fire, A.Z., Roskin, K.M., Schramm, C.A., Zhang, Z., et al. (2013c). Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. Nature *496*, 469–476.

Linde, M.E., Colquhoun, D.R., Ubaida Mohien, C., Kole, T., Aquino, V., Cotter, R., Edwards, N., Hildreth, J.E.K., and Graham, D.R. (2013). The conserved set of host proteins incorporated into HIV-1 virions suggests a common egress pathway in multiple cell types. J. Proteome Res. *12*, 2045–2054.

Liu, M., Yang, G., Wiehe, K., Nicely, N.I., Vandergrift, N.A., Rountree, W., Bonsignori, M., Alam, S.M., Gao, J., Haynes, B.F., et al. (2014). Polyreactivity and Autoreactivity among HIV-1 Antibodies. J Virol *89*, 784–798.

Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., et al. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. Immunity *39*, 758–769.

Longo, N.S., Sutton, M.S., Shiakolas, A.R., Guenaga, J., Jarosinski, M.C., Georgiev, I.S., McKee, K., Bailer, R.T., Louder, M.K., O'Dell, S., et al. (2016). Multiple Antibody Lineages in One Donor Target the Glycan-V3 Supersite of the HIV-1 Envelope Glycoprotein and Display a Preference for Quaternary Binding. Journal of Virology *90*, 10574–10586.

Lyles, R.H., Muñoz, A., Yamashita, T.E., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, C.R., Margolick, J.B., Phair, J.P., and Mellors, J.W. (2000). Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. J. Infect. Dis. *181*, 872–880.

MacLeod, D.T., Choi, N.M., Briney, B., Garces, F., Ver, L.S., Landais, E., Murrell, B., Wrin, T., Kilembe, W., Liang, C.-H., et al. (2016). Early Antibody Lineage Diversification and Independent Limb Maturation Lead to Broad HIV-1 Neutralization Targeting the Env High-Mannose Patch. Immunity *44*, 1215–1226.

Malherbe, D.C., Pissani, F., Sather, D.N., Guo, B., Pandey, S., Sutton, W.F., Stuart, A.B., Robins, H., Park, B., Krebs, S.J., et al. (2014). Envelope variants circulating as initial neutralization breadth developed in two HIV-infected subjects stimulate multiclade neutralizing antibodies in rabbits. J. Virol. *88*, 12949–12967.

Manivel, V., Sahoo, N.C., Salunke, D.M., and Rao, K.V. (2000). Maturation of an antibody response is governed by modulations in flexibility of the antigen-combining site. Immunity 13, 611–620.

Martin, A., and Scharff, M.D. (2002). AID and mismatch repair in antibody diversification. Nat. Rev. Immunol. *2*, 605–614.

Mascola, J.R., and Haynes, B.F. (2013). HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. Immunol. Rev. *254*, 225–244.

Mascola, J.R., Snyder, S.W., Weislow, O.S., Belay, S.M., Belshe, R.B., Schwartz, D.H., Clements, M.L., Dolin, R., Graham, B.S., Gorse, G.J., et al. (1996). Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. J. Infect. Dis. *173*, 340–348.

Mascola, J.R., Lewis, M.G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T.C., Hayes, D., Louder, M.K., Brown, C.R., Sapan, C.V., Frankel, S.S., et al. (1999). Protection of Macaques against Pathogenic Simian/Human Immunodeficiency Virus 89.6PD by Passive Transfer of Neutralizing Antibodies. J Virol *73*, 4009–4018.

Mascola, J.R., Stiegler, G., VanCott, T.C., Katinger, H., Carpenter, C.B., Hanson, C.E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S.S., Birx, D.L., et al. (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.

Matsuda, F., and Honjo, T. (1996). Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. Adv. Immunol. *62*, 1–29.

McCoy, L.E., and Burton, D.R. (2017). Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. Immunological Reviews *275*, 11–20.

McElrath, M.J., Corey, L., Montefiori, D., Wolff, M., Schwartz, D., Keefer, M., Belshe, R., Graham, B.S., Matthews, T., Wright, P., et al. (2000). A phase II study of two HIV type 1 envelope vaccines, comparing their immunogenicity in populations at risk for acquiring HIV type 1 infection. AIDS Vaccine Evaluation Group. AIDS Res. Hum. Retroviruses *16*, 907–919.

McLellan, J.S., Pancera, M., Carrico, C., Gorman, J., Julien, J.-P., Khayat, R., Louder, R., Pejchal, R., Sastry, M., Dai, K., et al. (2011). Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. Nature *480*, 336–343.

Medina-Ramírez, M., Sanders, R.W., and Sattentau, Q.J. (2017). Stabilized HIV-1 envelope glycoprotein trimers for vaccine use. Curr Opin HIV AIDS *12*, 241–249.

Meffre, E., Milili, M., Blanco-Betancourt, C., Antunes, H., Nussenzweig, M.C., and Schiff, C. (2001). Immunoglobulin heavy chain expression shapes the B cell receptor repertoire in human B cell development. J. Clin. Invest. *108*, 879–886.

Mendoza, D., Royce, C., Ruff, L.E., Ambrozak, D.R., Quigley, M.F., Dang, T., Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C., Migueles, S.A., et al. (2012). HLA B*5701-positive long-term nonprogressors/elite controllers are not distinguished from progressors by the clonal composition of HIV-specific CD8+ T cells. J. Virol. *86*, 4014–4018.

Mikell, I., Sather, D.N., Kalams, S.A., Altfeld, M., Alter, G., and Stamatatos, L. (2011). Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. PLoS Pathog. *7*, e1001251.

Mirande, M. (2008). Détournement d'ARNt cellulaire par le VIH1. Virologie *12*, 95–103.

Mishra, A.K., and Mariuzza, R.A. (2018). Insights into the Structural Basis of Antibody Affinity Maturation from Next-Generation Sequencing. Front Immunol *9*.

Moldt, B., Rakasz, E.G., Schultz, N., Chan-Hui, P.-Y., Swiderek, K., Weisgrau, K.L., Piaskowski, S.M., Bergman, Z., Watkins, D.I., Poignard, P., et al. (2012). Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 18921–18925.

Moldt, B., Le, K.M., Carnathan, D.G., Whitney, J.B., Schultz, N., Lewis, M.G., Borducchi, E.N., Smith, K.M., Mackel, J.J., Sweat, S.L., et al. (2016). Neutralizing antibody affords comparable protection against vaginal and rectal simian/human immunodeficiency virus challenge in macaques. AIDS *30*, 1543–1551.

Montefiori, D.C., Roederer, M., Morris, L., and Seaman, M.S. (2018). Neutralization tiers of HIV-1: Current Opinion in HIV and AIDS *13*, 128–136.

Moore, P.L. (2018). The Neutralizing Antibody Response to the HIV-1 Env Protein. Current HIV Research *16*, 21–28.

Moore, J.P., and Ho, D.D. (1995). HIV-1 neutralization: the consequences of viral adaptation to growth on transformed T cells. AIDS *9 Suppl A*, S117-136.

Moore, J.P., Cao, Y., Ho, D.D., and Koup, R.A. (1994). Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. J Virol *68*, 5142–5155.

Moore, P.L., Crooks, E.T., Porter, L., Zhu, P., Cayanan, C.S., Grise, H., Corcoran, P., Zwick, M.B., Franti, M., Morris, L., et al. (2006). Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. *80*, 2515–2528.

Mouquet, H., Scharf, L., Euler, Z., Liu, Y., Eden, C., Scheid, J.F., Halper-Stromberg, A., Gnanapragasam, P.N.P., Spencer, D.I.R., Seaman, M.S., et al. (2012). Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences *109*, E3268–E3277.

Moysi, E., Petrovas, C., and Koup, R.A. (2018). The role of follicular helper CD4 T cells in the development of HIV-1 specific broadly neutralizing antibody responses. Retrovirology *15*, 54.

Munro, J.B., Gorman, J., Ma, X., Zhou, Z., Arthos, J., Burton, D.R., Koff, W.C., Courter, J.R., Smith, A.B., Kwong, P.D., et al. (2014). Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. Science *346*, 759–763.

Murin, C.D., Julien, J.-P., Sok, D., Stanfield, R.L., Khayat, R., Cupo, A., Moore, J.P., Burton, D.R., Wilson, I.A., and Ward, A.B. (2014). Structure of 2G12 Fab2 in complex with soluble and fully glycosylated HIV-1 Env by negative-stain single-particle electron microscopy. J. Virol. *88*, 10177–10188.

Nicely, N.I., Wiehe, K., Kepler, T.B., Jaeger, F.H., Dennison, S.M., Rerks-Ngarm, S., Nitayaphan, S., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Robb, M.L., et al. (2015). Structural analysis of the unmutated ancestor of the HIV-1 envelope V2 region antibody CH58 isolated from an RV144 vaccine efficacy trial vaccinee. EBioMedicine *2*, 713–722.

Niessl, J., and Kaufmann, D.E. (2018). Harnessing T Follicular Helper Cell Responses for HIV Vaccine Development. Viruses *10*.

Nishimura, Y., and Martin, M.A. (2017). Of Mice, Macaques, and Men: Broadly Neutralizing Antibody Immunotherapy for HIV-1. Cell Host & Microbe *22*, 207–216.

Nishimura, Y., Igarashi, T., Haigwood, N., Sadjadpour, R., Plishka, R.J., Buckler-White, A., Shibata, R., and Martin, M.A. (2002). Determination of a Statistically Valid Neutralization Titer in Plasma That Confers Protection against Simian-Human Immunodeficiency Virus Challenge following Passive Transfer of High-Titered Neutralizing Antibodies. J Virol *76*, 2123–2130.

Nishimura, Y., Gautam, R., Chun, T.-W., Sadjadpour, R., Foulds, K.E., Shingai, M., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Donaldson, M., et al. (2017). Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. Nature *543*, 559–563.

Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. Nat. Rev. Immunol. *6*, 573–583.

Okada, T., and Cyster, J.G. (2006). B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. Curr. Opin. Immunol. *18*, 278–285.

Orwenyo, J., Cai, H., Giddens, J., Amin, M.N., Toonstra, C., and Wang, L.-X. (2017). Systematic Synthesis and Binding Study of HIV V3 Glycopeptides Reveal the Fine Epitopes of Several Broadly Neutralizing Antibodies. ACS Chemical Biology *12*, 1566–1575.

Ott, null (1997). Cellular proteins in HIV virions. Rev. Med. Virol. *7*, 167–180.

Padlan, E.A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. Mol. Immunol. *31*, 169–217.

Pan, R., Qin, Y., Banasik, M., Lees, W., Shepherd, A.J., Cho, M.W., and Kong, X.-P. (2018). Increased Epitope Complexity Correlated with Antibody Affinity Maturation and a Novel Binding Mode Revealed by Structures of Rabbit Antibodies against the Third Variable Loop (V3) of HIV-1 gp120. Journal of Virology *92*.

Pancera, M., and Wyatt, R. (2005). Selective recognition of oligomeric HIV-1 primary isolate envelope glycoproteins by potently neutralizing ligands requires efficient precursor cleavage. Virology *332*, 145–156.

Pancera, M., Yang, Y., Louder, M.K., Gorman, J., Lu, G., McLellan, J.S., Stuckey, J., Zhu, J., Burton, D.R., Koff, W.C., et al. (2013). N332-Directed broadly neutralizing antibodies use diverse modes of HIV-1 recognition: inferences from heavy-light chain complementation of function. PLoS ONE *8*, e55701.

Parren, P.W.H.I., Marx, P.A., Hessell, A.J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J.P., and Burton, D.R. (2001). Antibody Protects Macaques against Vaginal Challenge with a Pathogenic R5 Simian/Human Immunodeficiency Virus at Serum Levels Giving Complete Neutralization In Vitro. J Virol *75*, 8340–8347.

Pauthner, M., Havenar-Daughton, C., Sok, D., Nkolola, J.P., Bastidas, R., Boopathy, A.V., Carnathan, D.G., Chandrashekar, A., Cirelli, K.M., Cottrell, C.A., et al. (2017). Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using Optimized Approaches. Immunity *46*, 1073-1088.e6.

Pegu, A., Yang, Z., Boyington, J.C., Wu, L., Ko, S.-Y., Schmidt, S.D., McKee, K., Kong, W.-P., Shi, W., Chen, X., et al. (2014). Neutralizing antibodies to HIV-1 envelope protect more effectively in vivo than those to the CD4 receptor. Sci Transl Med *6*, 243ra88.

Pegu, A., Hessell, A.J., Mascola, J.R., and Haigwood, N.L. (2017). Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. Immunol. Rev. *275*, 296–312.

Pejchal, R., Doores, K.J., Walker, L.M., Khayat, R., Huang, P.-S., Wang, S.-K., Stanfield, R.L., Julien, J.-P., Ramos, A., Crispin, M., et al. (2011). A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. Science *334*, 1097–1103.

Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The Biochemistry of Somatic Hypermutation. Annual Review of Immunology *26*, 481–511.

Piantadosi, A., Panteleeff, D., Blish, C.A., Baeten, J.M., Jaoko, W., McClelland, R.S., and Overbaugh, J. (2009). Breadth of Neutralizing Antibody Response to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Affected by Factors Early in Infection but Does Not Influence Disease Progression. J Virol *83*, 10269–10274.

Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F., Hu, D., Tappero, J.W., Choopanya, K., and Bangkok Vaccine Evaluation Group (2006). Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. J. Infect. Dis. *194*, 1661–1671.

Plotkin, S.A. (2008). Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. Clin. Infect. Dis. *47*, 401–409.

Poignard, P., Moulard, M., Golez, E., Vivona, V., Franti, M., Venturini, S., Wang, M., Parren, P.W.H.I., and Burton, D.R. (2003). Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies. J. Virol. *77*, 353–365.

Popovic, M., Flomenberg, N., Volkman, D.J., Mann, D., Fauci, A.S., Dupont, B., and Gallo, R.C. (1984). Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. Science *226*, 459–462.

Porter, R.R. (1991). Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins. 1972. Scand. J. Immunol. *34*, 381–389.

Poulsen, T.R., Jensen, A., Haurum, J.S., and Andersen, P.S. (2011). Limits for antibody affinity maturation and repertoire diversification in hypervaccinated humans. J. Immunol. *187*, 4229–4235.

Pritchard, L.K., Harvey, D.J., Bonomelli, C., Crispin, M., and Doores, K.J. (2015a). Cell- and Protein-Directed Glycosylation of Native Cleaved HIV-1 Envelope. Journal of Virology *89*, 8932–8944.

Pritchard, L.K., Spencer, D.I.R., Royle, L., Bonomelli, C., Seabright, G.E., Behrens, A.-J., Kulp, D.W., Menis, S., Krumm, S.A., Dunlop, D.C., et al. (2015b). Glycan clustering stabilizes the mannose patch of HIV-1 and preserves vulnerability to broadly neutralizing antibodies. Nature Communications *6*.

Pritchard, L.K., Vasiljevic, S., Ozorowski, G., Seabright, G.E., Cupo, A., Ringe, R., Kim, H.J., Sanders, R.W., Doores, K.J., Burton, D.R., et al. (2015c). Structural Constraints Determine the Glycosylation of HIV-1 Envelope Trimers. Cell Rep *11*, 1604–1613.

Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nat. Rev. Immunol. *6*, 741–750.

Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., and Baumeister, K. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature *313*, 277–284.

Reh, L., Magnus, C., Kadelka, C., Kühnert, D., Uhr, T., Weber, J., Morris, L., Moore, P.L., and Trkola, A. (2018). Phenotypic deficits in the HIV-1 envelope are associated with the maturation of a V2-directed broadly neutralizing antibody lineage. PLoS Pathog. *14*, e1006825.

Reynard, F., Bedin, F., and Verrier, B. (2006). HIV1 Env N-glycans and their interactions with the immune system. Virologie *10*, 129–141.

Richert, L., Lhomme, E., Fagard, C., Lévy, Y., Chêne, G., and Thiébaut, R. (2015). Recent developments in clinical trial designs for HIV vaccine research. Human Vaccines & Immunotherapeutics *11*, 1022–1029.

Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J., and Petropoulos, C.J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 4144–4149.

Roderiquez, G., Oravecz, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D.C., Mostowski, H., and Norcross, M.A. (1995). Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. J. Virol. *69*, 2233–2239.

Rolland, M., Edlefsen, P.T., Larsen, B.B., Tovanabutra, S., Sanders-Buell, E., Hertz, T., deCamp, A.C., Carrico, C., Menis, S., Magaret, C.A., et al. (2012). Increased HIV-1 vaccine efficacy against viruses with genetic signatures in Env V2. Nature *490*, 417–420.

Ruprecht, C.R., Krarup, A., Reynell, L., Mann, A.M., Brandenberg, O.F., Berlinger, L., Abela, I.A., Regoes, R.R., Günthard, H.F., Rusert, P., et al. (2011). MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1. J. Exp. Med. *208*, 439–454.

Sabouri, Z., Schofield, P., Horikawa, K., Spierings, E., Kipling, D., Randall, K.L., Langley, D., Roome, B., Vazquez-Lombardi, R., Rouet, R., et al. (2014). Redemption of autoantibodies on anergic B cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity. Proceedings of the National Academy of Sciences *111*, E2567–E2575.

Sanders, R.W., and Moore, J.P. (2017). Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. Immunol. Rev. *275*, 161–182.

Sanders, R.W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeen, A., de Val, N., Kim, H.J., Blattner, C., de la Peña, A.T., Korzun, J., et al. (2013). A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog. *9*, e1003618.

Sanders, R.W., van Gils, M.J., Derking, R., Sok, D., Ketas, T.J., Burger, J.A., Ozorowski, G., Cupo, A., Simonich, C., Goo, L., et al. (2015). HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. Science *349*, aac4223–aac4223.

Sanjuan Nandin, I., Fong, C., Deantonio, C., Torreno-Pina, J.A., Pecetta, S., Maldonado, P., Gasparrini, F., Ordovas-Montanes, J., Kazer, S.W., Kjaer, S., et al. (2017). Novel in vitro booster vaccination to rapidly generate antigen-specific human monoclonal antibodies. The Journal of Experimental Medicine *214*, 2471–2490.

Sarzotti-Kelsoe, M., Bailer, R.T., Turk, E., Lin, C., Bilska, M., Greene, K.M., Gao, H., Todd, C.A., Ozaki, D.A., Seaman, M.S., et al. (2014). Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. J. Immunol. Methods *409*, 131–146.

Sather, D.N., Armann, J., Ching, L.K., Mavrantoni, A., Sellhorn, G., Caldwell, Z., Yu, X., Wood, B., Self, S., Kalams, S., et al. (2009). Factors Associated with the Development of Cross-Reactive Neutralizing Antibodies during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Journal of Virology *83*, 757–769.

Sather, D.N., Carbonetti, S., Malherbe, D.C., Pissani, F., Stuart, A.B., Hessell, A.J., Gray, M.D., Mikell, I., Kalams, S.A., Haigwood, N.L., et al. (2014). Emergence of broadly neutralizing antibodies and viral coevolution in two subjects during the early stages of infection with human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. *88*, 12968–12981.

Saunders, K.O., Wang, L., Joyce, M.G., Yang, Z.-Y., Balazs, A.B., Cheng, C., Ko, S.-Y., Kong, W.-P., Rudicell, R.S., Georgiev, I.S., et al. (2015). Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection. J. Virol. *89*, 8334–8345.

Scharf, L., Wang, H., Gao, H., Chen, S., McDowall, A.W., and Bjorkman, P.J. (2015). Broadly Neutralizing Antibody 8ANC195 Recognizes Closed and Open States of HIV-1 Env. Cell *162*, 1379–1390.

Scheepers, C., Shrestha, R.K., Lambson, B.E., Jackson, K.J.L., Wright, I.A., Naicker, D., Goosen, M., Berrie, L., Ismail, A., Garrett, N., et al. (2015). Ability to develop broadly neutralizing HIV-1 antibodies is not restricted by the germline Ig gene repertoire. J. Immunol. *194*, 4371–4378.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T.Y.K., Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., Velinzon, K., et al. (2011). Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding. Science *333*, 1633–1637.

Schelonka, R.L., Zemlin, M., Kobayashi, R., Ippolito, G.C., Zhuang, Y., Gartland, G.L., Szalai, A., Fujihashi, K., Rajewsky, K., and Schroeder, H.W. (2008). Preferential use of DH reading frame 2 alters B cell development and antigen-specific antibody production. J. Immunol. *181*, 8409–8415.

Schiller, J., and Chackerian, B. (2014). Why HIV virions have low numbers of envelope spikes: implications for vaccine development. PLoS Pathog. *10*, e1004254.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S41-52.

Seaman, M.S., Janes, H., Hawkins, N., Grandpre, L.E., Devoy, C., Giri, A., Coffey, R.T., Harris, L., Wood, B., Daniels, M.G., et al. (2010). Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. J. Virol. *84*, 1439–1452.

Sharma, S.K., de Val, N., Bale, S., Guenaga, J., Tran, K., Feng, Y., Dubrovskaya, V., Ward, A.B., and Wyatt, R.T. (2015). Cleavage-Independent HIV-1 Env Trimers Engineered as Soluble Native Spike Mimetics for Vaccine Design. Cell Reports *11*, 539–550.

Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspect Med *1*, a006841.

Shi, B., Ma, L., He, X., Wang, X., Wang, P., Zhou, L., and Yao, X. (2014). Comparative analysis of human and mouse immunoglobulin variable heavy regions from IMGT/LIGM-DB with IMGT/HighV-QUEST. Theor Biol Med Model *11*, 30.

Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M.W., and Martin, M.A. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. Nat. Med. *5*, 204–210.

Shingai, M., Nishimura, Y., Klein, F., Mouquet, H., Donau, O.K., Plishka, R., Buckler-White, A., Seaman, M., Piatak, M., Lifson, J.D., et al. (2013). Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. Nature *503*, 277–280.

Shingai, M., Donau, O.K., Plishka, R.J., Buckler-White, A., Mascola, J.R., Nabel, G.J., Nason, M.C., Montefiori, D., Moldt, B., Poignard, P., et al. (2014). Passive transfer of modest titers of potent and broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibodies block SHIV infection in macaques. J Exp Med *211*, 2061–2074.

Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miiro, G., et al. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. J. Virol. *83*, 7337–7348.

Simonich, C.A., Williams, K.L., Verkerke, H.P., Williams, J.A., Nduati, R., Lee, K.K., and Overbaugh, J. (2016). HIV-1 Neutralizing Antibodies with Limited Hypermutation from an Infant. Cell *166*, 77–87.

Sliepen, K., Medina-Ramírez, M., Yasmeen, A., Moore, J.P., Klasse, P.J., and Sanders, R.W. (2015). Binding of inferred germline precursors of broadly neutralizing HIV-1 antibodies to native-like envelope trimers. Virology *486*, 116–120.

Sok, D., Laserson, U., Laserson, J., Liu, Y., Vigneault, F., Julien, J.-P., Briney, B., Ramos, A., Saye, K.F., Le, K., et al. (2013). The Effects of Somatic Hypermutation on Neutralization and Binding in the PGT121 Family of Broadly Neutralizing HIV Antibodies. PLoS Pathogens *9*, e1003754.

Sok, D., Doores, K.J., Briney, B., Le, K.M., Saye-Francisco, K.L., Ramos, A., Kulp, D.W., Julien, J.-P., Menis, S., Wickramasinghe, L., et al. (2014). Promiscuous glycan site recognition by antibodies to the high-mannose patch of gp120 broadens neutralization of HIV. Sci Transl Med *6*, 236ra63.

Sok, D., Briney, B., Jardine, J.G., Kulp, D.W., Menis, S., Pauthner, M., Wood, A., Lee, E.-C., Le, K.M., Jones, M., et al. (2016a). Priming HIV-1 broadly neutralizing antibody precursors in human Ig loci transgenic mice. Science *353*, 1557–1560.

Sok, D., Pauthner, M., Briney, B., Lee, J.H., Saye-Francisco, K.L., Hsueh, J., Ramos, A., Le, K.M., Jones, M., Jardine, J.G., et al. (2016b). A Prominent Site of Antibody Vulnerability on HIV Envelope Incorporates a Motif Associated with CCR5 Binding and Its Camouflaging Glycans. Immunity *45*, 31–45.

Steichen, J.M., Kulp, D.W., Tokatlian, T., Escolano, A., Dosenovic, P., Stanfield, R.L., McCoy, L.E., Ozorowski, G., Hu, X., Kalyuzhniy, O., et al. (2016). HIV Vaccine Design to Target Germline Precursors of Glycan-Dependent Broadly Neutralizing Antibodies. Immunity *45*, 483–496.

de Taeye, S.W., Ozorowski, G., Torrents de la Peña, A., Guttman, M., Julien, J.-P., van den Kerkhof, T.L.G.M., Burger, J.A., Pritchard, L.K., Pugach, P., Yasmeen, A., et al. (2015). Immunogenicity of Stabilized HIV-1 Envelope Trimers with Reduced Exposure of Non-neutralizing Epitopes. Cell *163*, 1702–1715.

de Taeye, S.W., de la Peña, A.T., Vecchione, A., Scutigliani, E., Sliepen, K., Burger, J.A., van der Woude, P., Schorcht, A., Schermer, E.E., van Gils, M.J., et al. (2018). Stabilization of the gp120 V3 loop through hydrophobic interactions reduces the immunodominant V3-directed non-neutralizing response to HIV-1 envelope trimers. J. Biol. Chem. *293*, 1688–1701.

Theys, K., Libin, P., Pineda-Peña, A.-C., Nowé, A., Vandamme, A.-M., and Abecasis, A.B. (2018). The impact of HIV-1 within-host evolution on transmission dynamics. Curr Opin Virol *28*, 92–101.

Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J. Immunol. Methods *329*, 112–124.

Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., et al. (2008). Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. J. Virol. *82*, 12449–12463.

Tomaras, G.D., Ferrari, G., Shen, X., Alam, S.M., Liao, H.-X., Pollara, J., Bonsignori, M., Moody, M.A., Fong, Y., Chen, X., et al. (2013). Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, 9019–9024.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature *302*, 575–581.

Trovato, M., D'Apice, L., Prisco, A., and De Berardinis, P. (2018). HIV Vaccination: A Roadmap among Advancements and Concerns. International Journal of Molecular Sciences *19*, 1241.

Upadhyay, C., Feyznezhad, R., Yang, W., Zhang, H., Zolla-Pazner, S., and Hioe, C.E. (2018). Alterations of HIV-1 envelope phenotype and antibody-mediated neutralization by signal peptide mutations. PLoS Pathog. *14*, e1006812.

Vega, L.E., and Espinoza, L.R. (2018). HIV infection and its effects on the development of autoimmune disorders. Pharmacol. Res. *129*, 1–9.

Verkoczy, L., and Diaz, M. (2014). Autoreactivity in HIV-1 broadly neutralizing antibodies: implications for their function & induction by vaccination. Curr Opin HIV AIDS *9*, 224–234.

Vogt, V.M. (1997). Retroviral Virions and Genomes. In Retroviruses, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Voss, J.E., Andrabi, R., McCoy, L.E., de Val, N., Fuller, R.P., Messmer, T., Su, C.-Y., Sok, D., Khan, S.N., Garces, F., et al. (2017). Elicitation of Neutralizing Antibodies Targeting the V2 Apex of the HIV Envelope Trimer in a Wild-Type Animal Model. Cell Rep *21*, 222–235.

Walker, L.M., Huber, M., Doores, K.J., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J.-P., Wang, S.-K., Ramos, A., Chan-Hui, P.-Y., Moyle, M., et al. (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. Nature *477*, 466–470.

Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science *301*, 1374–1377.

Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J., and Hood, L. (1980). The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. Nature *283*, 497–499.

Whitney, J.B., and Ruprecht, R.M. (2004). Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. Curr. Opin. Infect. Dis. *17*, 17–26.

Williams, K.L., Wang, B., Arenz, D., Williams, J.A., Dingens, A.S., Cortez, V., Simonich, C.A., Rainwater, S., Lehman, D.A., Lee, K.K., et al. (2018). Superinfection Drives HIV Neutralizing Antibody Responses from Several B Cell Lineages that Contribute to a Polyclonal Repertoire. Cell Reports *23*, 682–691.

Wilson, P.C., Bouteiller, O. de, Liu, Y.-J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D., and Pascual, V. (1998). Somatic Hypermutation Introduces Insertions and Deletions into Immunoglobulin V Genes. The Journal of Experimental Medicine *187*, 59–70.

Wu, X., Sambor, A., Nason, M.C., Yang, Z.-Y., Wu, L., Zolla-Pazner, S., Nabel, G.J., and Mascola, J.R. (2008). Soluble CD4 broadens neutralization of V3-directed monoclonal antibodies and guinea pig vaccine sera against HIV-1 subtype B and C reference viruses. Virology *380*, 285–295.

Wu, X., Zhou, T., Zhu, J., Zhang, B., Georgiev, I., Wang, C., Chen, X., Longo, N.S., Louder, M., McKee, K., et al. (2011). Focused Evolution of HIV-1 Neutralizing Antibodies Revealed by Structures and Deep Sequencing. Science *333*, 1593–1602.

Xiao, X., Chen, W., Feng, Y., Zhu, Z., Prabakaran, P., Wang, Y., Zhang, M.-Y., Longo, N.S., and Dimitrov, D.S. (2009). Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: Implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens. Biochemical and Biophysical Research Communications *390*, 404–409.

Xu, K., Acharya, P., Kong, R., Cheng, C., Chuang, G.-Y., Liu, K., Louder, M.K., O'Dell, S., Rawi, R., Sastry, M., et al. (2018). Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. Nature Medicine *24*, 857.

Yaari, G., Vander Heiden, J.A., Uduman, M., Gadala-Maria, D., Gupta, N., Stern, J.N.H., O'Connor, K.C., Hafler, D.A., Laserson, U., Vigneault, F., et al. (2013). Models of Somatic Hypermutation Targeting and Substitution Based on Synonymous Mutations from High-Throughput Immunoglobulin Sequencing Data. Frontiers in Immunology *4*.

Yang, G., Holl, T.M., Liu, Y., Li, Y., Lu, X., Nicely, N.I., Kepler, T.B., Alam, S.M., Liao, H.-X., Cain, D.W., et al. (2013). Identification of autoantigens recognized by the 2F5 and 4E10 broadly neutralizing HIV-1 antibodies. J. Exp. Med. *210*, 241–256.

Yu, Y., Ceredig, R., and Seoighe, C. (2017). A Database of Human Immune Receptor Alleles Recovered from Population Sequencing Data. The Journal of Immunology *198*, 2202–2210.

Zanetti, G., Briggs, J.A.G., Grünewald, K., Sattentau, Q.J., and Fuller, S.D. (2006). Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. PLoS Pathog. *2*, e83.

Zhang, Z., Li, S., Gu, Y., Xia, N., Zhang, Z., Li, S., Gu, Y., and Xia, N. (2016). Antiviral Therapy by HIV-1 Broadly Neutralizing and Inhibitory Antibodies. International Journal of Molecular Sciences *17*, 1901.

Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.-Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y.D., Scheid, J., Shi, W., Xu, L., et al. (2010). Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of HIV-1 by Antibody VRC01. Science *329*, 811–817.

Zhou, T., Zhu, J., Wu, X., Moquin, S., Zhang, B., Acharya, P., Georgiev, I.S., Altae-Tran, H.R., Chuang, G.-Y., Joyce, M.G., et al. (2013). Multi-donor Analysis Reveals Structural Elements, Genetic Determinants, and Maturation Pathway for Effective HIV-1 Neutralization by VRCO1-class Antibodies. Immunity *39*, 245–258.

Zhou, T., Zheng, A., Baxa, U., Chuang, G.-Y., Georgiev, I.S., Kong, R., O'Dell, S., Shahzad-Ul-Hussan, S., Shen, C.-H., Tsybovsky, Y., et al. (2018). A Neutralizing Antibody Recognizing Primarily N-Linked Glycan Targets the Silent Face of the HIV Envelope. Immunity *48*, 500-513.e6.

Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Lifson, J.D., Arthur, L.O., Liu, J., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (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.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J.D., Grisé, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature *441*, 847–852.

Zolla-Pazner, S., deCamp, A.C., Cardozo, T., Karasavvas, N., Gottardo, R., Williams, C., Morris, D.E., Tomaras, G., Rao, M., Billings, E., et al. (2013). Analysis of V2 antibody responses induced in vaccinees in the ALVAC/AIDSVAX HIV-1 vaccine efficacy trial. PLoS ONE *8*, e53629.