

ÉCOLE DOCTORALE Santé Sciences et Technologies

Inserm U966

Morphogenèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites

THÈSE présentée par :

Suzie THENIN

soutenue le : **13 avril 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Virologie

**Transmission mère-enfant du Virus de
l'Immunodéficience Humaine de type 1 :
rôle des anticorps neutralisants maternels et
propriétés biologiques des virus transmis**

THÈSE dirigée par :

Monsieur BARIN Francis
Madame BRAIBANT Martine

Professeur, Université de Tours
Maître de Conférences, HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Madame CHAIX Marie-Laure
Madame MOOG Christiane

Maître de Conférences, HDR, Université Paris V
Directeur de recherche INSERM, Strasbourg

JURY :

Monsieur BARIN Francis
Madame BRAIBANT Martine
Madame CHAIX Marie-Laure
Madame MOOG Christiane
Monsieur THIBAUT Gilles
Monsieur WEISSEHORN Winfried

Professeur, Université de Tours
Maître de Conférences, HDR, Université de Tours
Maître de Conférences, HDR, Université Paris V
Directeur de recherche INSERM, Strasbourg
Professeur, Université de Tours
Professeur, Université de Grenoble

Remerciements

Que de bons moments passés au sein de cette équipe U966. Les midis pizza, la raclette de Noël et les sorties labo resteront de très bons souvenirs. Merci à vous tous pour ces 5 années passées parmi vous.

Francis et Martine, merci à tous les 2 de m'avoir fait confiance dès le M2 et permis de poursuivre en thèse. Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre écoute au cours de ces 5 années. Grâce à vous j'ai pu présenter mes travaux et tout ce travail a été récompensé. J'ai un très bon souvenir du congrès à Boston (CROI 2011), toute fière devant mon poster et vous pour immortaliser ce moment ! Merci Martine pour ta présence au quotidien, de répondre à mes nombreuses questions et pour toutes nos conversations loin de la science. MERCI à tous les 2.

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse pour le temps précieux qu'ils ont consacré à ce travail. Merci à Marie-Laure Chaix et à Christiane Moog d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs et à Winfried Weissenhorn en tant qu'examineur. Merci à Gilles Thibault d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie également L'Agence Nationale de Recherche sur le Sida (ANRS), Sidaction et le « Fonds de dotation Pierre Bergé » pour leur soutien financier.

Merci à Thierry Moreau pour sa gentillesse et pour tout le temps consacré à notre modèle de trimère.

Philippe. Merci à toi pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe. Merci pour ta gentillesse et tes encouragements, et merci à toi de nous suivre dans nos grandes découvertes scientifiques !

Denys ! Parfois ça a été dur de passer quelques commandes !! Merci pour votre humour et votre sympathie, et merci à la Brand Entreprise pour son magnifique calendrier. D'ailleurs, on attend toujours l'édition 2012 ! Et puis... on fait comme ça !

Merci à mes secrétaires préférées Nadine et Sarah. Merci pour votre aide au quotidien et pour votre bonne humeur. Nadine, désolé d'avoir investie ton armoire à fourniture et merci à toi de toujours assister à nos soutenances de thèse. Sarah, merci pour ta gentillesse et bravo à toi pour avoir succédé avec brio à Nadine !

Marion. Ma petite Marion. Pendant plus de 3 ans tu as été ma voisine de bureau. Merci à toi de ne pas avoir balancé tout mon bazar quand je m'étais chez toi ! Merci pour ta présence, ton écoute et ta gentillesse. On en a partagé des choses, et de très belles mêmes ! Je pense à ce 23 juillet 2011 quand tu étais à mes côtés pour mon mariage. Merci à toi pour tout ce que tu as fait pour moi. Montréal compte une nouvelle habitante maintenant et ils en ont bien de la chance. Je sais que tu réussiras tout ce que tu entreprendras là-bas et j'espère t'y voir bientôt !

Ma petite Manue ! La Mac Giver du labo et le photographe officiel du groupe ! Toujours prête à m'aider quand tu me voyais découragée devant mes 2 palettes de flasques ! Merci pour tout ce que tu fais pour nous tous au labo. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne. Merci pour toutes tes photos floues ou pas floues qui resteront de très bons souvenirs ! Et un grand merci pour ton aide précieuse pour ces dernières manips de ma thèse.

Pauline. Je me souviendrai toujours de tes yeux émerveillés quand on a fêté ton anniversaire avec 2 magnifiques religieuses taille XXL ! Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, pour ta bonne humeur et ton naturel ! Merci de ne pas m'avoir laissée toute seule sur la porte des « phrases insolites » ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour l'avenir et j'espère que tu trouveras le post-doc de tes rêves.

Laura. Je n'en reviens toujours pas qu'on ait réussi à te faire croire que tes cellules étaient contaminées pour que tu ne lances pas ta manip de la mort ! Mais, c'était pour la bonne cause !! Bon courage pour la fin de ta thèse et plein de bonnes choses pour cette future vie à 3.

Anne ! Pas toujours facile dans le bureau avec Alain, Vincent et... Giuseppe !!!
Je t'admire pour ta force de travail et ta gentillesse. Tu vas bientôt partir à Toulouse... je te souhaite d'y passer de bons moments, de tomber sur une super équipe et surtout n'oublies pas d'aller encourager le Stade Toulousain !
Vincent...ou Chouette Man ! Notre super héros du labo ! Un problème de manip, marre d'un clonage... au secours ! Chouette Man ! Il arrive, pipettes en mains et blouse en cape, et résout tous nos problèmes !! Ça rassure d'avoir un super héros près de soi ! Merci pour ta bonne humeur quotidienne, pour nous avoir fait réviser notre culture G avec les QPUC... J'espère te voir un jour à la télé en train de manger des vers et des yeux de poisson (bah...) !!

Elodie ! Ma voisine de gauche. Tu en as eu du pot ! Ton ordinateur faisait office de barrage, et ne m'a donc pas permis de trop m'étaler sur ton bureau !!! Merci à toi pour ta gentillesse et ton savoir-faire !

Valentina ! Merci pour ton accent chantant de l'Italie ! J'ai bien rigolé dans le L3 avec ta boîte de « sournageants » !! Merci pour ta gentillesse et de m'avoir appris à faire de vrais gnocchis comme chez toi !

Tout le monde ne le sait peut-être pas mais le Père Noël (le vrai !) est parmi nous au labo ! Et oui Alain, tu es démasqué !! Merci de m'avoir initiée au monde merveilleux du séquençage et de la phylogénie ! Merci pour les magnifiques affiches de thèse toutes aussi jolies les unes que les autres. J'ai hâte de voir la mienne !!

Romu ! Ça va gars ? Tu m'as fait découvrir les commandes Dutscher, et pour ça, je ne te remercie pas !!!! J'rigole bien sûr ! Tu étais là quand j'ai commencé en M2 et tu seras là pour ma soutenance. Entre temps, tu as eu le temps de partir 2 ans aux States. C'est là que je me rends compte que le temps passe vite !! Merci pour ta bonne humeur et ta sympathie Maître Yoda !

Loïc... je te préviens tout de suite, je ne tiendrais pas le mètre de Vodka caramel ! A la place, je te propose un mètre de grenadine à l'eau !! Ça te va j'espère !!!

Thank you to our Thai friends, Tanawan, Wootichai and Sayamon. Thank you for sharing your delicious food with us, but may be a bit too spicy for me ! Tanawan, I had a wonderful time with you in Bangkok. Thank you for introducing me to your country and culture.

Eun-Yeung ! Thank you for teaching us how to say U966 in korean (U khu yuk yuk). Thanks for your smile and your happiness. Good luck with your new destination, Glasgow.

Sandra, bienvenue dans le bureau des filles !! Merci pour ta sympathie et de prendre des nouvelles de ma thèse dès qu'on se croise au labo.

Antoine. Merci pour tes mots d'encouragements, et à mon tour je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse.

Alexis ! J'ai été contente de travailler avec toi pendant ces quelques mois. J'espère que bientôt tu trouveras une thèse qui te plaira. Bon courage à toi pour la suite.

Aux nouvelles thésardes, Mélanie et Audrey, aux M2, Marion, Charlotte, Anthony et Damien, et aux petits nouveaux, Amélie, Vanessa et Benoit. Bon courage pour le M2 ou pour ces 3 prochaines années ! Sachez que vous êtes tombés dans une super équipe ! Profitez-en à fond !

Eric ! Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton humour. Par contre ce n'est pas bien de taguer tes initiales partout dans la rue... je n'arrête pas de voir des « EP » sur chaque trottoir de Tours !

Merci aux locataires de Vialle, Manue, Jean-Christophe M et Christophe pour votre gentillesse. Merci à JC pour nos conversations post-doc entre les rayons chips et gâteaux de Super U !

Catherine, Christine, Jean-Christophe P, Alain Goudeau. Merci pour votre gentillesse et votre soutien.

Merci aux grands sportifs de CHG, même si j'étais loin d'être la plus assidue !! Caro, Cédric, Noémie, Mathilde, Sandra, Hubert, Delphine, Marion et Manue, merci à vous pour les bons moments passés ensemble, les soirées de Noël et du téléthon délirantes ! J'espère refaire un body attack d'anthologie avec vous avant de partir !

La première chose que j'ai faite en arrivant en Tours a été de m'inscrire au badminton. Quelle sage décision ! J'y ai trouvé de super amis. Le bad est une grande famille et je vous remercie de m'avoir accueillie parmi vous. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, pour les repas du dimanche, les soirées jeux, et pour tous ces rires. Le bad m'a énormément apporté, m'a fait grandir. J'ai réalisé des choses dont je ne pensais pas être capable. Quand je pense à nous tous, réunis, avec nous tee-shirts blanc, orange et maintenant rouge... oui le bad est une grande famille ! Merci à vous tous.

Merci à tous les copains de Tours et d'un peu plus loin maintenant. Karine et Manu, Aurore et Louis, Anne et Séb, Elo et Cécé, Marie et Loïc, Claire et Lawrence, Alain et Nathalie. Merci à vous de m'avoir accueillie parmi vous, pour toutes les soirées passées ensemble, les karaokés, toutes les raclettes, les franches rigolades pendant les parties de cranium, et j'en passe... Merci à tous les petits, Anna, Arthur, Alban, Awen, Charline, Lucie, Baptiste, Louise, Camille et Manon. C'est trop super de les voir grandir, rire et de les entendre m'appeler « zizie » !!!

Un grand merci à toute ma famille ! Mon frère et ma sœur, toujours là pour me soutenir. Grâce à toi Antoine, maintenant je speak mieux english !! Julie, à toi aussi un grand merci pour ta présence à mes côtés le 23 juillet 2011, et merci de faire tout ce trajet pour être présente pour ma soutenance. J'ai hâte de venir te voir dans le Sud ou ailleurs. Merci à mes oncles, tantes, cousins, cousines pour leurs encouragements et leur soutien. Faites chauffer les vuvuzelas !! A mes grands-parents qui me demandent souvent si tout se passe bien à l'école et si j'ai des bonnes notes !! Merci à vous tous pour votre soutien.

« Je voudrais remercier mon papa et ma maman sans qui je ne serais pas là aujourd'hui ». Notre phrase !! Mais tellement vraie ! Je me souviens de ce 17 septembre 2005, quand tu m'as laissé sur le pas de la porte de mon nouveau chez-moi et que tu es retourné à Brétigny... une nouvelle vie commençait. Merci à tous les 2 pour tout ce que vous avez fait pour moi. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour ces longues conversations quand j'avais des doutes, des joies à partager. Vous m'avez toujours soutenu, près à venir me voir en congrès, à m'encourager. Merci, merci, merci.

Bien évidemment, merci à celui qui partage ma vie, Julien. Merci pour cette merveilleuse journée du 23 juillet 2011 ! Merci de t'être aussi bien occupé de moi, de m'avoir soutenue et aussi consolée pendant toute cette période de thèse. Merci pour ton soutien inconditionnel, tes encouragements sans fin. J'espère que bientôt nous trouverons une belle destination de post-doc !

Résumé

La transmission mère-enfant est un modèle naturel permettant d'explorer le rôle des anticorps neutralisants dans la protection vis-à-vis de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Ceci est d'autant plus vrai lorsque la transmission se fait tardivement, notamment en peripartum, le fœtus ou nouveau-né étant alors exposé au virus en présence d'anticorps maternels passifs pré-existants dont certains ont une activité neutralisante de plus ou moins large spectre. Dans une étude antérieure, l'équipe avait montré que la présence ou les titres élevés d'anticorps neutralisant un isolat primaire de sous-type CRF01_AE, MBA, étaient associés à un faible taux de transmission intrapartum du VIH-1 en Thaïlande. De plus, une analyse moléculaire des virus transmis de la mère à l'enfant avait suggéré que deux sites potentiels de N-glycosylation (PNGS) de la glycoprotéine de surface gp120, N301 et N384, pourraient conférer un avantage sélectif aux variants transmis.

L'objectif de ce travail était de déterminer les caractéristiques moléculaires de l'enveloppe de la souche MBA liées à la neutralisation et d'analyser les propriétés biologiques de variants maternels et de variants transmis à l'enfant selon que ceux-ci possédaient ou non les deux PNGS N301 et/ou N384.

Nous avons tout d'abord confirmé que l'isolat MBA pourrait être un bon indicateur de la présence d'anticorps protecteurs *in vivo*, puis mis en évidence que l'enveloppe de MBA possédait une région variable V2 exceptionnellement longue et fortement glycosylée, responsable en partie de la résistance à la neutralisation de ce virus. Nous avons ensuite réalisé une analyse des propriétés antigéniques et fonctionnelles de variants transmis à l'enfant et de variants maternels qui a mis en évidence une très grande hétérogénéité de leurs propriétés biologiques, et ce malgré la présence d'une population virale génétiquement homogène chez l'enfant. Nous n'avons pas identifié de propriétés spécifiques conférant un avantage sélectif aux virus transmis à l'enfant. Cependant, nous avons montré que les virus transmis à l'enfant étaient plus sensibles à la neutralisation par les anticorps monoclonaux humains largement neutralisants PG9 et PG16 que les variants maternels, et confirmé que les PNGS N301 et N384 sembleraient jouer un rôle dans la résistance à la neutralisation autologue. Le matériel biologique généré nous a permis d'identifier deux résidus très conservés de la gp120, une lysine en position 168 (K168) dans la région variable V2 et une isoleucine en position 215 (I215) dans le domaine constant C2, impliqués dans la sensibilité à la neutralisation par PG9 et/ou PG16.

Mots clés : VIH-1, transmission mère-enfant, anticorps neutralisants, glycoprotéines d'enveloppe.

Abstract

Mother-to-child transmission provides a natural model for studying the role of neutralizing antibodies in preventing human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, particularly when transmission occurs late in pregnancy, when the fetus or the newborn is exposed to the virus in presence of passively transferred maternal antibodies. In a previous study, we showed that either the presence or high titers of neutralizing antibodies against a CRF01_AE strain, MBA, were associated with a lower rate of intrapartum HIV-1 transmission in Thailand. Furthermore, the molecular characteristics of viruses transmitted from mother to their child suggested that two potential N-linked glycosylation (PNGS) located in the surface envelope glycoprotein gp120, N301 and N384, may confer a selective advantage to the transmitted variants.

The aim of this thesis was to define the molecular characteristics of the envelope glycoprotein of MBA related to neutralization, and to analyze the biological properties of maternal and infant viral variants according to the presence or not of PNGS N301 and/or N384.

We first confirmed that the MBA strain may be indicative of a protective antibody response *in vivo*, and we demonstrated that the envelope glycoprotein of MBA showed an unusually long and highly glycosylated V2 domain which was partially involved in resistance to neutralization of this strain. We then realized in depth an analysis of the antigenic and functional properties of the envelope glycoprotein derived from maternal and infant variants. Our study showed a wide spectrum of biological properties despite the presence of a genetically homogeneous viral population in the children. We did not identify any specific property conferring a selective advantage for transmission of the virus to the infants. Nevertheless, we showed that the variants transmitted to the infants were more sensitive than the maternal variants to neutralization by the broadly neutralizing human monoclonal antibodies PG9 and PG16, and that the two PNGS N301 and N384 may play a role in resistance to autologous neutralization. The biological material generated allowed us to identify two gp120 cross-clade conserved residues, a lysine at position 168 (K168) in the V2 variable region and an isoleucine at position 215 (I215) in the C2 constant domain, involved in sensitivity to PG9 and/or PG16.

Keywords: HIV-1, mother-to-child transmission, neutralizing antibodies, envelope glycoproteins.

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Table des matières	3
Liste des tableaux	5
Liste des figures	6
Introduction	9
I- Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)	12
I.1- Structure du VIH-1	12
I.2- Organisation génomique du VIH-1	13
I.3- Cycle réplicatif du VIH-1	15
I.4- Classification et distribution géographique du VIH-1	18
I.5- Origine du VIH-1	21
I.6- Diversité génétique du VIH-1	23
I.7- Physiopathologie de l'infection à VIH-1	24
II- Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1	31
II.1- Synthèse et glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe	31
II.2- Structure des glycoprotéines d'enveloppe	33
II.2.1- Structure de la gp120	33
II.2.2- Structure de la gp41	40
II.3- Modèles de trimères des spicules d'enveloppe du VIH-1 et du SIV	42
II.4- Mécanismes de l'entrée virale	47
II.4.1- Fixation au récepteur CD4	47
II.4.2- Fixation aux corécepteurs	49
II.4.3- Le mécanisme de fusion	51
II.4.4- Autres récepteurs impliqués dans l'entrée virale	51
II.5- Le tropisme viral	52
III- La neutralisation du VIH-1	54
III.1- La neutralisation virale par les anticorps	54

III.2- La réponse neutralisante anti-VIH-1 au cours de l'infection naturelle.....	57
III.2.1- Cinétique d'apparition des anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe	57
III.2.2. Réponse neutralisante autologue.....	58
III.2.3- Réponse neutralisante hétérologue et de large spectre	63
III.2.4- Anticorps monoclonaux humains largement neutralisants	69
III.3- Activité protectrice <i>in vivo</i> des anticorps largement neutralisants.....	88
IV- Transmission mère-enfant du VIH-1	91
IV.1- Modes de transmission et mécanismes	91
IV.1.1- Transmission <i>in utero</i>	91
IV.1.2- Transmission intrapartum	93
IV.1.3- Transmission post-partum	94
IV.2- Transmission mère-enfant du VIH-1 et anticorps neutralisants	94
IV.2.1- Le goulet d'étranglement (« genetic bottleneck »)	95
IV.2.2. Rôle des anticorps neutralisants dans la transmission mère-enfant	97
IV.2.3. Caractéristiques des virus transmis	98
IV.2.4. Activité protectrice <i>in vivo</i> des anticorps neutralisants dans le contexte de la transmission mère-enfant	99
Objectifs du travail.....	101
Résultats & discussion	105
I) Caractéristiques moléculaires de la souche MBA liées à la neutralisation	107
II) Propriétés antigéniques et fonctionnelles des virus transmis à l'enfant	111
III) Etude de la sensibilité à la neutralisation par les anticorps monoclonaux PG9 et PG16 de variants du VIH-1 de sous-type CRF01_AE et B.....	115
Conclusion & perspectives.....	131
Bibliographie.....	135

Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des différents modèles de trimères d'enveloppe du SIV.....	44
Tableau 2. Récapitulatif des différents modèles de trimères d'enveloppe du VIH-1.....	46
Tableau 3. Activité neutralisante des anticorps monoclonaux humains.....	71
Tableau 4. Etude de la population virale de l'enfant infecté par le VIH-1.	96

Liste des figures

Figure 1. Première visualisation en microscopie électronique de l'agent étiologique du SIDA, alors appelé LAV	10
Figure 2. Structure du VIH-1	13
Figure 3. Organisation génomique du VIH-1	14
Figure 4. Cycle réplcatif du VIH-1	15
Figure 5. Répartition géographique et prévalence des différents sous-types et formes recombinantes circulantes du VIH-1	20
Figure 6. Organisation génomique de la forme recombinante circulante CRF01_AE	21
Figure 7. Représentation phylogénétique des groupes M, N, O et P du VIH-1, et transmission des souches simiennes de SIVcpzPtt et SIVgor à l'Homme	22
Figure 8. Mécanismes de diversité du VIH-1	23
Figure 9. Transmission sexuelle chez la femme et phase aiguë d'infection	25
Figure 10. Mécanismes de transmission du VIH-1 via les cellules dendritiques	27
Figure 11. Formation d'une synapse virologique suite à l'interaction entre l'enveloppe du VIH-1 et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$	28
Figure 12. Progression de l'infection par le VIH-1	29
Figure 13. N-glycosylation du précurseur gp160	32
Figure 14. Structure secondaire de la gp120	34
Figure 15. Structure cristallographique du monomère (A) et trimère (B) de la gp120 liée au CD4	35
Figure 16. Comparaison de la structure cristallographique de la gp120 liée ou non au CD4	36
Figure 17. Structure du domaine V1/V2 de la gp120	37
Figure 18. Structure de la boucle V3 de la gp120	38
Figure 19. Immunogénicité de la gp120	38
Figure 20. Structure secondaire de la gp41	41
Figure 21. Structure cristallographiques des hélices HR-1 et HR2 de l'ectodomaine de la gp41	42
Figure 22. Modélisation de la surface de virions du SIV et du VIH-1	43
Figure 23. Modélisation de trimère d'enveloppe du SIV exposés à la surface des virions	45
Figure 24. Modélisation de trimère d'enveloppe du VIH-1 exposés à la surface de virions ou solubilisés	47
Figure 25. Représentation schématique des modifications conformationnelles du trimère d'enveloppe du VIH-1 induits par la liaison au CD4	49
Figure 26. Position des sites de liaison au récepteur et co-récepteur au sein de la structure de la gp120 liée ou non au CD4	50
Figure 27. Modèle de l'interaction entre la gp120 et le corécepteur CCR5	50
Figure 28. Représentation schématique des différentes étapes du processus de fusion	51
Figure 29. Tropisme du VIH-1	53
Figure 30. Mécanismes d'action antivirale des anticorps (exemple du VIH-1)	55

Figure 31. Mécanismes d'action des anticorps neutralisants et non neutralisants	56
Figure 32. Cinétique d'apparition des anticorps au cours de l'infection naturelle.....	58
Figure 33. Evolution de la réponse neutralisante au cours des premiers mois suivant la primo-infection et échappement du virus aux anticorps neutralisants autologues.....	59
Figure 34. Mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse neutralisante.....	61
Figure 35. Structure du spicule d'enveloppe du VIH-1	66
Figure 36. Modélisation de la localisation des épitopes cibles des anticorps monoclonaux humains largement neutralisants sur un trimère de glycoprotéines d'enveloppe	70
Figure 37. Structure cristallographique de l'anticorps monoclonal IgG1 b12.....	72
Figure 38. Structure du spicule d'enveloppe du VIH-1 lié au fragment Fab de l'anticorps b12.....	73
Figure 39. Structure cristallographique de l'anticorps VRC01 liée à la gp120	75
Figure 40. Activité neutralisante des anticorps VRC01 et b12 sur un panel de 190 virus de différents sous-types	76
Figure 41. Epitope et structure cristallographique de l'anticorps 2G12	77
Figure 42. Structure cristallographique de fragment Fab de l'anticorps PGT128	79
Figure 43. Représentation schématique de la gp41 et des séquences cibles des anticorps 2F5 et 4E10.....	80
Figure 44. Structure du fragment Fab de l'anticorps 2F5 et interaction avec l'épitope cible	82
Figure 45. Structure de l'anticorps 4E10 et interaction avec l'épitope cible	84
Figure 46. Structures cristallographiques des fragments Fab des anticorps PG16 et PG9	86
Figure 47. Mécanismes de transmission virale de la mère au fœtus/enfant.....	93
Figure 48. IgG maternelles dans les sérums de fœtus et nouveaux nés.....	97

Introduction

Histoire d'une découverte.

En 1981, le CDC d'Atlanta (Centers for Disease Control) signale dans plusieurs grandes villes américaines une recrudescence des cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de sarcomes de Kaposi chez des hommes homosexuels, affections rares touchant habituellement uniquement les sujets immunodéprimés. Ces mêmes symptômes ont ensuite été observés chez des toxicomanes ainsi que des patients hémophiles transfusés, laissant penser que l'agent infectieux en cause était un virus. Ce nouveau type d'immunodéficience fût appelé « syndrome d'immunodéficience acquise » (SIDA) en 1982.

C'est en 1983 que l'agent étiologique du SIDA est isolé et décrit pour la première fois par Françoise Barré-Sinoussi au sein de l'équipe de Luc Montagnier, à partir d'une biopsie de ganglion lymphatique d'un patient présentant une lymphadénopathie généralisée, correspondant au stade pré-SIDA (**Figure 1**). Il s'agit d'un Rétrovirus, initialement nommé « Lymphadenopathy Associated Virus » ou LAV, qui fût par la suite appelé Virus de l'Immunodéficience Humaine ou VIH en 1986 (Barré-Sinoussi, 2003; Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). La même année, un second virus du SIDA est identifié et est nommé VIH-2 (Barin *et al.*, 1985; Clavel *et al.*, 1986).

Cette découverte a été récompensée vingt-cinq ans plus tard avec un prix Nobel de Médecine décerné à Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier en 2008.

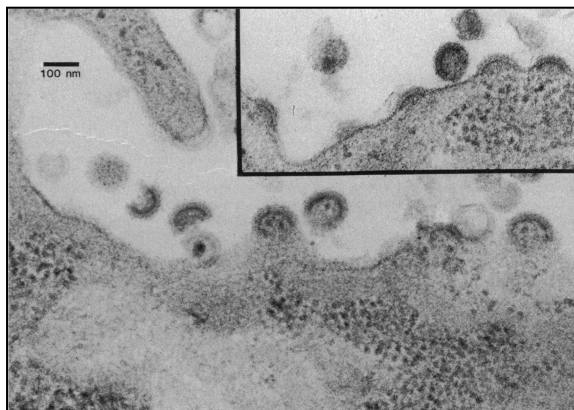


Figure 1. Première visualisation en microscopie électronique de l'agent étiologique du SIDA, alors appelé LAV. Coupes de lymphocytes provenant de cordon ombilical produisant du virus. Les différents stades du bourgeonnement viral à la surface cellulaire sont visualisés (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983).

Rapidement après cette découverte, des tests de dépistages devenaient disponibles en 1985 et le génome viral était séquencé la même année (Wain-Hobson *et al.*, 1985). Depuis, de nombreuses avancées scientifiques ont permis une meilleure compréhension du virus, tant sur le point de la physiopathologie de l'infection que sur sa structure.

Néanmoins, malgré ces progrès, le VIH a continué à se propager et l'épidémie a pris des proportions mondiales. En 2009, on estimait à 33,3 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH dans le monde, à 2,6 millions les personnes nouvellement infectées (soit 7000 nouvelles infections chaque jour) et à 1,8 millions les personnes décédées des suites de l'infection (Rapport annuel 2010 de l'ONUSIDA). Les enfants de moins de 15 ans sont fortement touchés avec 2,5 millions d'enfants infectés par le VIH, et 260 000 décès rapportés en 2009 (Rapport annuel 2010 de l'ONUSIDA).

L'élaboration d'un vaccin permettrait de ralentir la progression de la maladie. Cependant, la diversité du virus et sa capacité à échapper au système immunitaire constituent les difficultés majeures pour l'élaboration de celui-ci. L'un des objectifs d'un tel vaccin serait l'induction d'anticorps largement neutralisants. Cela passe par la compréhension du rôle de ces anticorps, ainsi que l'identification des déterminants moléculaires des protéines d'enveloppe du VIH-1 associés à la neutralisation par des anticorps neutralisants de large spectre, ou associés à l'échappement à la neutralisation. Le contexte de la transmission mère-enfant (TME) offre la possibilité d'étudier le rôle de tels anticorps dans la protection vis-à-vis de l'infection puisque, au moins dans le cas de la transmission périnatale, l'enfant est exposé au virus en présence d'anticorps maternels passifs.

I- Le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)

I.1- Structure du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 80 à 120 nm de diamètre. La **figure 2** présente la structure de la particule virale mature. De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue :

- L'enveloppe externe du virus, constituée d'une bicouche phospholipidique empruntée à la membrane plasmique de la cellule hôte infectée dans laquelle sont enchâssées deux glycoprotéines d'enveloppe virale : une sous-unité de surface gp120 et une sous-unité transmembranaire gp41, associées de façon non covalente pour former des trimères d'hétérodimères gp120/gp41 (Wyatt & Sodroski, 1998; Zhu *et al.*, 2006). La bicouche lipidique contient également des protéines d'origine cellulaire telles que des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'actine et l'ubiquitine (Arthur *et al.*, 1992).
- La matrice, formée par l'assemblage et l'oligomérisation de la protéine de matrice (MA ou p17) tapisse la face intérieure de l'enveloppe, renferme la protéase virale (PR ou p11) et entoure la capside virale. Les protéines de matrice sont myristylées ce qui leur permet de s'implanter par des interactions hydrophobes dans la bicouche phospholipidique de l'enveloppe (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008).
- La capside, de forme conique, est formée de l'assemblage de la protéine de capside (CA ou p24) (Mateu, 2009). Cette capside renferme le génome viral, constitué de deux molécules d'ARN monocaténares de polarité positive, auxquelles sont associées la nucléocapside (NC ou p7), la protéine p6 ainsi que les enzymes virales nécessaires à la réplication du virus : la transcriptase inverse (RT ou p66/51) et l'intégrase (IN ou p32) (Arhel, 2010).

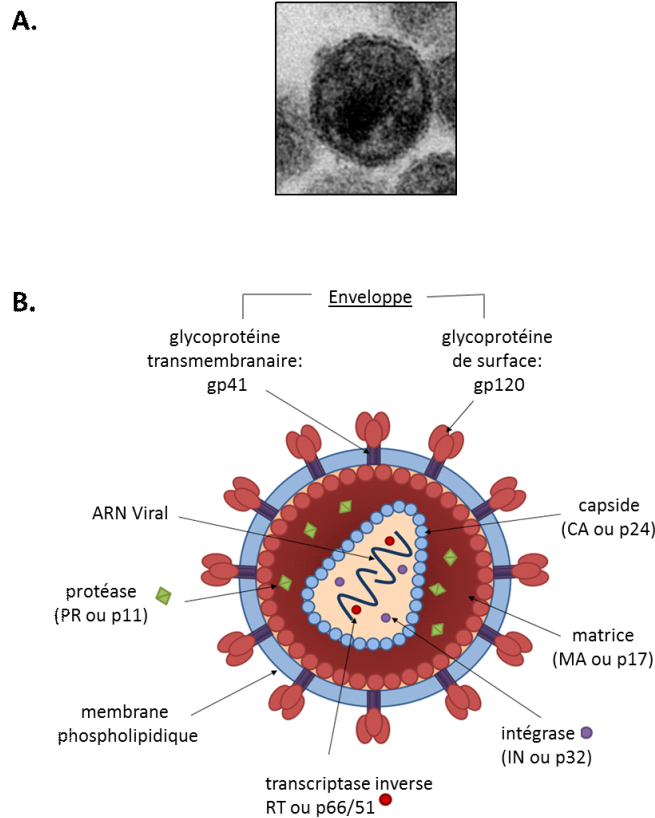


Figure 2. Structure du VIH-1. **A.** Particule virale mature observée en microscopie électronique (plateforme RIO de microscopie électronique). **B.** Représentation schématique d'une particule virale infectieuse. Le VIH-1 est un virus enveloppé, constitué d'une capsidie conique qui renferme deux molécules d'ARN monocaténaïres de polarité positive associées aux nucléoprotéïnes, ainsi que les enzymes virales. La capsidie est entourée d'une matrice puis d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéïnes d'enveloppe gp120 et gp41 (d'après Ganser-Pornillos *et al.*, 2008).

I.2- Organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH-1, intégré sous forme d'ADN proviral, est constitué d'environ 9,8 Kb. Il présente à chacune de ses extrémités une séquence inversée répétée non codante (*Long Terminal Repeat* ou LTR), composée de trois régions : U3, R et U5. La région LTR située à l'extrémité 5' contient le promoteur ainsi que l'ensemble des signaux nécessaires à la régulation de la transcription de l'ADN proviral, alors que la région LTR en position 3' contient les signaux de terminaison de la transcription et de polyadénylation (Freed, 2001) (**Figure 3**).

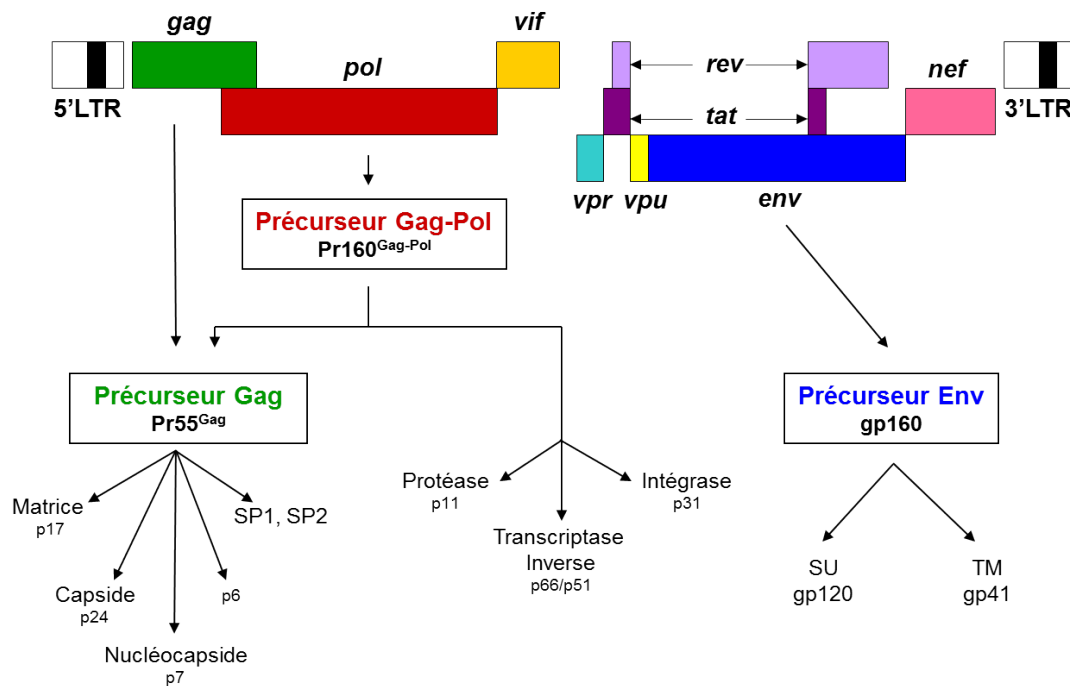


Figure 3. Organisation génomique du VIH-1. Le génome viral, situé entre deux séquences LTR, contient trois gènes principaux, *gag*, *pol* et *env*, codant respectivement les protéines structurales, les enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe, ainsi que six gènes accessoires, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *nef*, *rev*, codant pour les protéines de régulation.

Les régions codantes, situées entre les deux séquences LTR et issues de cadres de lecture chevauchant, codent pour de nombreuses protéines indispensables à la multiplication virale et au pouvoir pathogène du virus. Les trois gènes principaux, *gag*, *pol* et *env*, codent pour des protéines structurales et enzymatiques communes à tous les Rétrovirus (Peterlin & Trono, 2003). Le gène *gag* (*group-specific antigen*) code pour un précurseur de 55 KDa (Pr55^{Gag}) qui, après clivage par la protéase virale, donne naissance aux protéines structurales de matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), à la protéine p6 et à deux peptides « spacer », SP1 et SP2. Cette polyprotéine joue un rôle essentiel dans l'assemblage viral (Muriaux & Darlix, 2010). Le gène *pol* (*polymerase*), en phase avec le gène *gag*, code une polyprotéine précurseur (Pr160^{Gag-Pol}) qui, après clivage par la protéase virale, génère trois protéines enzymatiques indispensables à la multiplication du virus : la protéase (PR), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT) (Peterlin & Trono, 2003). Le gène *env* (*envelope*) code pour un précurseur de 160 KDa nommé gp160. Contrairement aux précurseurs Gag et Gag-Pol, clivés par la protéase virale, le précurseur Env est clivé par une protéase cellulaire, la furine, pour donner naissance aux deux glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Checkley *et al.*, 2011).

L'ARN viral code également pour deux protéines régulatrices via deux gènes composés de deux exons : Tat (transactivateur de la transcription) et Rev (régulateur de l'expression virale), qui assurent des fonctions régulatrices indispensables à la multiplication virale (Grewe & Uberla, 2010; Romani *et al.*, 2010); ainsi que pour quatre protéines accessoires : Vif (infectiosité virale), Vpr (protéine virale R), Vpu (protéine virale U) et Nef (facteur de régulation négative), qui contribuent au pouvoir pathogène du virus (Dubé *et al.*, 2010; Goila-Gaur & Strebel, 2008; Kogan & Rappaport, 2011; Roeth & Collins, 2006).

I.3- Cycle réplcatif du VIH-1

Le cycle réplcatif du VIH-1 est divisé en deux phases : une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce comprend la fixation des glycoprotéines d'enveloppe à la membrane cellulaire de la cellule cible suivie de la fusion des membranes virale et cellulaire, la rétro-transcription de l'ARN viral en un ADN double brin, ainsi que son intégration au sein du génome cellulaire. La phase tardive comprend, quant à elle, la transcription et la régulation de l'expression du génome proviral ainsi que tous les processus d'assemblage, de bourgeonnement et de maturation des virions (Peterlin & Trono, 2003) (**Figure 4**).

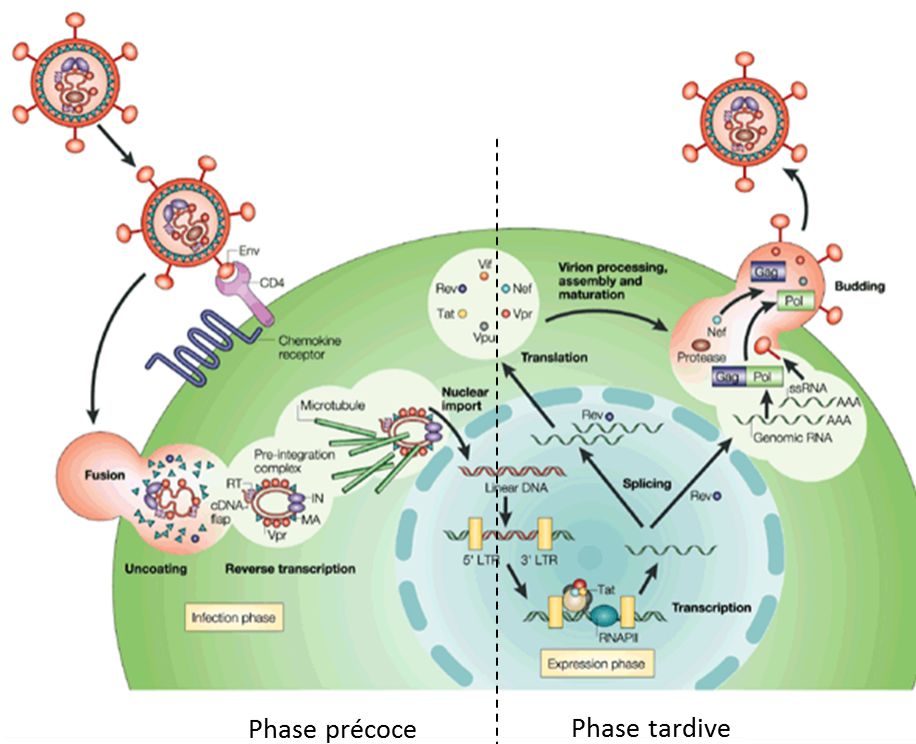


Figure 4. Cycle réplcatif du VIH-1. Le virus pénètre dans la cellule cible suite à la fixation des glycoprotéines d'enveloppe sur les récepteurs cellulaires, suivie de la fusion des membranes virale et

cellulaire. La capside virale entre alors dans le cytoplasme de la cellule infectée et libère son contenu. Les ARN viraux sont rétrotranscrits en ADNc puis intégrés au génome de la cellule hôte. Après transcription et expression des protéines structurales et enzymatiques, l'assemblage du génome et des différentes protéines virales au niveau de la membrane cellulaire va permettre la formation de nouvelles particules virales. La maturation des virions néoformés se poursuivra après le bourgeonnement donnant ainsi naissance à des particules virales infectieuses (Adapté de Peterlin & Trono, 2003).

▪ Etapes précoces du cycle de multiplication virale

Le VIH-1 infecte principalement les cellules CD4⁺ du système immunitaire telles que les lymphocytes T, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (Peterlin & Trono, 2003). L'entrée du VIH dans la cellule cible constitue une étape clé du processus d'infection. La glycoprotéine de surface gp120 se fixe initialement au récepteur cellulaire CD4 présent à la surface des cellules cibles (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984). Cette interaction induit des changements conformationnels au sein de la gp120, entraînant l'exposition du site de fixation aux corécepteurs dont les deux principaux sont les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 (Feng *et al.*, 1996; Rizzuto *et al.*, 1998). Cette seconde interaction induit de nouvelles modifications conformationnelles au sein de la glycoprotéine transmembranaire gp41, conduisant à l'exposition de son domaine externe contenant le peptide de fusion qui pourra alors s'ancrer dans la membrane de la cellule cible. Un rapprochement des membranes est alors obtenu par un processus de réarrangement structural complet de la gp41, aboutissant à la fusion des membranes virale et cellulaire, et à la pénétration de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule hôte (Doms & Moore, 2000). Une fois internalisée, la capside se désassemble libérant ainsi son contenu (Arhel, 2010). Les ARN viraux sont ensuite rétrotranscrits par la transcriptase inverse en un brin d'ADN complémentaire. L'ARN viral est ensuite dégradé par l'activité ribonucléase H (RNaseH) de la transcriptase inverse et la synthèse du second brin d'ADN aboutit alors à la formation d'un ADN bicaténaire (Arhel, 2010; Levin *et al.*, 2010). Les nouveaux brins d'ADN associés avec l'intégrase, la transcriptase inverse, la matrice et la protéine accessoire Vpr vont former un complexe de pré-intégration qui migre au noyau. Plusieurs signaux de localisation nucléaire présents sur l'intégrase, la matrice et Vpr permettent le passage de l'ADN viral à travers les pores nucléaires (Peterlin & Trono, 2003). L'ADN double brin est alors intégré dans le génome de la cellule hôte sous l'action de l'intégrase, préférentiellement dans des régions actives de la chromatine. Cette intégration donne naissance à un provirus intégré dans la cellule cible (Arhel, 2010; Peterlin & Trono, 2003).

▪ Etapes tardives du cycle de multiplication virale

Une fois intégré, le virus utilise la machinerie cellulaire pour la transcription et la traduction des ARN messagers viraux. L'ADN proviral est transcrit en ARN messagers par l'ARN Polymérase II cellulaire. Dans un premier temps, les ARN messagers multi-épissés codant les protéines régulatrices Tat, Rev ainsi que la protéine accessoire Nef sont synthétisés, exportés dans le cytoplasme et traduits en protéines (Turner & Summers, 1999). Les protéines Tat et Rev assurent les fonctions régulatrices indispensables à la multiplication virale. La protéine Tat est un puissant transactivateur de la transcription qui augmente le taux de transcription des ARN viraux, et par conséquent, le niveau de synthèse des protéines virales au cours de l'infection (Romani *et al.*, 2010). La protéine virale Rev va ensuite jouer un rôle essentiel dans l'épissage et dans le transport vers le cytoplasme des ARN messagers (Grewe & Uberla, 2010). Dans un second temps, les ARN mono- et non-épissés sont synthétisés tardivement, exportés vers le cytoplasme et sont traduits en précurseurs polyprotéiques, qui sont ensuite clivés pour former les protéines structurales et enzymatiques nécessaires à la formation de nouveaux virions. La traduction des gènes *gag* et *gag-pol* conduit à la synthèse de deux précurseur polyprotéiques Gag et Gag-Pol qui, après clivage par la protéase virale, donnent naissance aux protéines de matrice, capsid et nucléocapsid ainsi qu'aux enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase et protéase). Le précurseur Env gp160, codé par le gène *env*, est clivé par une protéase cellulaire aboutissant à la formation de complexes trimériques d'hétérodimères gp120/gp41, associés de façon non-covalente. Après la transcription, certains ARN viraux ayant échappé aux phénomènes d'épissage sont exportés vers le cytoplasme, puis acheminés aux sites d'assemblage viraux pour servir de génome aux nouvelles particules virales en cours de formation (Lu *et al.*, 2011). L'assemblage des différents éléments viraux s'effectue au niveau de sites spécifiques des membranes plasmiques ou endosomales où vont bourgeonner des virions immatures. En bourgeonnant, le virus emprunte une partie de la membrane plasmique dans laquelle sont enchâssés les trimères de glycoprotéines d'enveloppe gp120/gp41. De façon concomitante au bourgeonnement, les particules virales relarguées dans le milieu extracellulaire subissent un processus de maturation protéolytique des polyprotéines Gag et Gag-Pol, essentiel à l'acquisition de leur pouvoir infectieux (Briggs & Kräusslich, 2011).

I.4- Classification et distribution géographique du VIH-1

▪ Classification du VIH-1

Le VIH-1 est un virus appartenant à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus* (Ratner *et al.*, 1985; Wain-Hobson *et al.*, 1985). L'analyse phylogénétique de nombreux variants du VIH-1 a permis de classer ces souches en quatre groupes : le groupe M (Major) découvert en 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983) ; le groupe O (Outlier) découvert en 1990 (De Leys *et al.*, 1990) ; le groupe N (New ou non-M, non-O) identifié en 1998 (Simon *et al.*, 1998) et le groupe P récemment décrit en 2009 (Plantier *et al.*, 2009). Les variants appartenant au groupe O sont localisés au Cameroun et dans certains pays limitrophes d'Afrique centrale. De même, les variants des groupes N et P ont été retrouvés au sein d'un nombre limité d'individus provenant du Cameroun (Ayoub *et al.*, 2000; Plantier *et al.*, 2009; Tebit & Arts, 2011). Au contraire, les virus appartenant au groupe M ont une répartition mondiale et sont responsables de la pandémie actuelle (Perrin *et al.*, 2003; Tebit & Arts, 2011).

Au sein du groupe M, les virus sont répartis en neuf sous-types : A-D, F-H, J et K (Robertson *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2008). Le sous-type A est subdivisé en sous-sous-type A1, A2, et plus récemment A3 et A4 (Vidal *et al.*, 2006). Le sous-type F est également subdivisé en sous-sous-types F1 et F2. Ces différents sous-types présentent une différence de 25 à 30% dans les séquences protéiques d'enveloppe, 20% dans Gag et 10% dans Pol (Gao *et al.*, 1998). Le séquençage complet du génome du VIH a conduit à l'identification de formes recombinantes circulantes (CRF) et formes recombinantes uniques (URF), résultant de recombinaison inter-sous-types au sein d'individus infectés par des souches appartenant à au moins deux sous-types différents. Une forme recombinante circulante est identifiée dès lors qu'elle est retrouvée chez au moins trois individus sans lien épidémiologique direct, alors qu'une forme recombinante unique n'est décrite que chez un seul individu (Taylor *et al.*, 2008). Ces formes recombinantes deviennent de plus en plus fréquentes et complexes (McCutchan, 2006). A ce jour, 49 CRF ont été décrites (HIV Sequence Database). Parmi les CRF, les plus connues et fréquemment retrouvées sont les formes recombinantes CRF01_AE (recombinaison entre des virus de sous-type A et des virus de sous-type E, virus non décrit à ce jour) responsables de l'épidémie qui sévit en Asie du Sud-Est, et CRF02_AG (recombinaison entre des virus de sous-type A et des virus de sous-type G) prédominante en Afrique de l'Ouest.

▪ Distribution géographique du VIH-1

Les virus du groupe M, responsables de la pandémie, sont à l'origine de 95% des infections. Les sous-types prédominants sont les sous-types A, B et C. Entre 2004 et 2007, le sous-type C représente 48% des infections dans le monde alors que les sous-types A, B, D et G représentent respectivement 12%, 11%, 2% et 5% des infections. Les sous-types F, H, J et K regroupés ne sont responsables que d'environ 1% des infections. Les formes circulantes CRF01_AE et CRF02_AG comptent respectivement pour 5% et 8% des cas, alors que toutes les formes recombinantes regroupées sont responsables de 20% des infections globales (Buonaguro *et al.*, 2007; Hemelaar *et al.*, 2011) (**Figure 5A**).

La répartition géographique des différents sous-types et formes recombinantes du VIH-1 diffère selon l'ancienneté de l'épidémie dans le pays et selon les migrations de populations. Les virus du groupe M ont une répartition mondiale alors que les virus des groupes N, O et P sont localisés essentiellement au Cameroun. Les virus de sous-type A sont retrouvés en Afrique centrale et en Afrique de l'Est ainsi qu'en Europe de l'Est. Les virus de sous-type B sont majoritairement présents en Amérique du Nord et en Amérique Latine, en Europe occidentale, en Australie et dans certains pays d'Asie du Sud-Est, d'Afrique du Nord et du Sud. Les virus de sous-type C sont prédominants en Afrique de l'Est et du Sud ainsi qu'en Inde. Enfin, les virus de sous-type D sont présents en Afrique Centrale et de l'Est. Les formes recombinantes CRF01_AE et CRF02_AG sont prédominantes respectivement en Asie du Sud-Est (Thaïlande, Cambodge, Vietnam) et en Afrique de l'Ouest (Hemelaar *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2008) (**Figure 5B**).

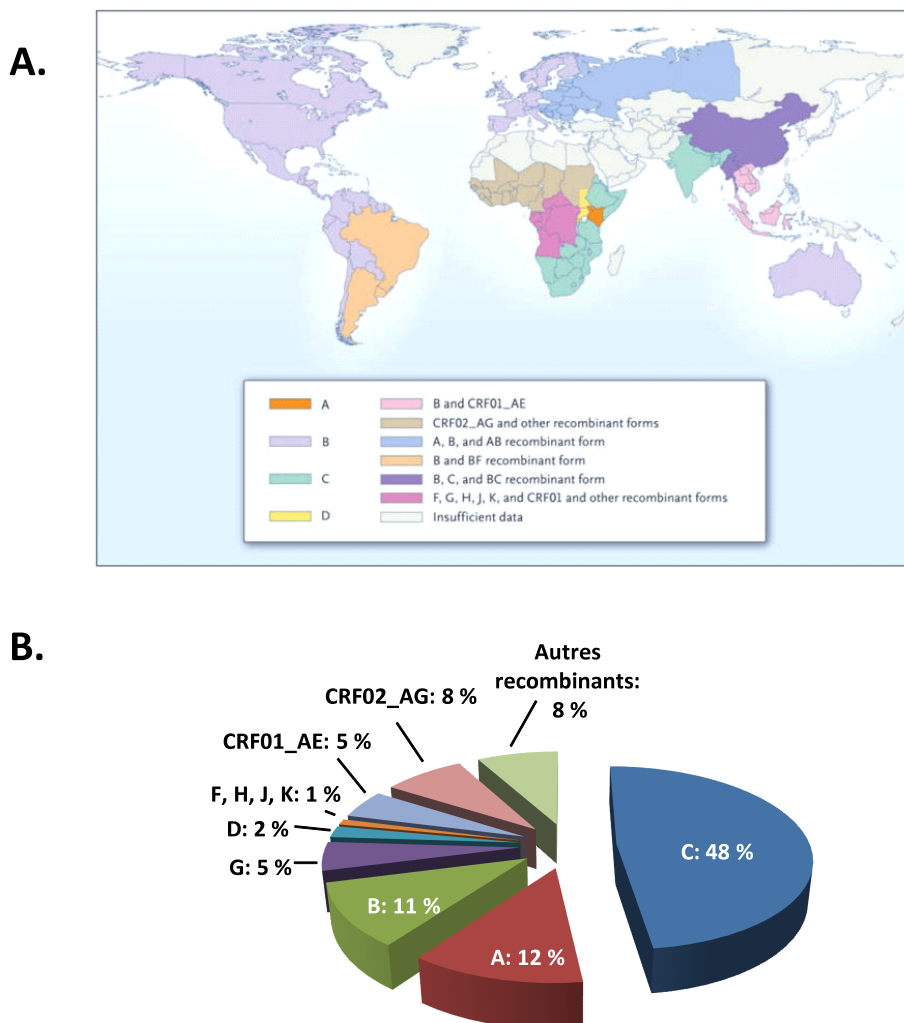


Figure 5. Répartition géographique et prévalence des différents sous-types et formes recombinantes circulantes du VIH-1. A. Distribution mondiale du VIH-1 (Taylor *et al.*, 2008). B. Prévalence des différents sous-types et formes recombinantes circulantes (d'après Hemelaar *et al.*, 2011).

▪ La forme recombinante CRF01_AE

La forme recombinante circulante CRF01_AE, étudiée au cours de mes travaux de thèse, a été identifiée à la fin des années 1980 (McCutchan *et al.*, 1992; Ou *et al.*, 1992). Les virus de cette forme recombinante sont responsables de l'épidémie qui sévit en Asie du Sud-Est (Thaïlande, Vietnam, Cambodge, Taiwan et Chine) mais sont également présents dans certains pays d'Afrique Centrale comme la République Centrafricaine, le Cameroun et la République Démocratique du Congo (Requejo, 2006). Les variants CRF01_AE, d'abord nommés sous-type E, sont issus de la recombinaison inter-sous-type entre des virus de sous-type A et des virus de sous-type E, bien qu'aucun virus parental de sous-type E n'ait été

identifié à ce jour (Carr *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1996) (**Figure 6**). La comparaison de souches provenant de Thaïlande et de République Centrafricaine (CAR) a mis en évidence l'existence d'un ancêtre commun recombinant A/E, probablement originaire d'Afrique Centrale où des virus de sous-type A et de sous-type parental E doivent avoir coexisté (Gao *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1993; Nkengasong *et al.*, 1994). Le sous-type CRF01_AE est donc originaire d'Afrique centrale, puis a ensuite diffusé en Thaïlande.

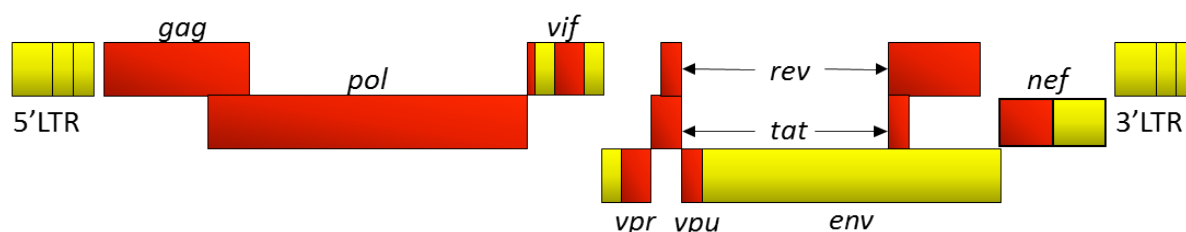


Figure 6. Organisation génomique de la forme recombinante circulante CRF01_AE. Les gènes *gag*, *pol*, *vif*, 3' *vpr*, *rev*, *tat*, *vpu*, et 5' *nef* (en orange) appartiennent au sous-type A, les gènes *env*, *vif*, 5' *vpr*, 3' *nef* ainsi que les LTR (en jaune) appartiennent au sous-type E (d'après HIV Sequence Database).

I.5- Origine du VIH-1

Depuis la découverte de lentivirus chez le chimpanzé (Huet *et al.*, 1990; Peeters *et al.*, 1989), cette espèce a été suspectée d'être à l'origine de la pandémie du VIH chez l'Homme. Les groupes M, N, O et P du VIH-1 sont le résultat de quatre franchissements d'espèce indépendants à l'Homme de souches de SIV (Simian Immunodeficiency Virus) infectants les chimpanzés (SIVcpz) et les gorilles (SIVgor) d'Afrique Equatoriale de l'Ouest. Des études d'épidémiologie moléculaire des virus SIVcpz infectant les chimpanzés du Cameroun ont établi que les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (*Ptt*) sont le réservoir naturel des ancêtres du VIH-1 du groupe M, responsable de la pandémie actuelle, et du VIH-1 du groupe N, identifié au sein de quelques individus vivant au Cameroun (Keele *et al.*, 2006). Les virus VIH-1 des groupes M et N sont donc issus de deux transmissions indépendantes inter-espèces de virus SIVcpz*Ptt* à l'Homme (Keele *et al.*, 2006) (**Figure 7**). Les virus des groupes O et P, quant à eux, sont phylogénétiquement proches d'une souche de virus simien SIVgor qui infecte les Gorilles de la sous-espèce *Gorilla gorilla gorilla* vivant au Cameroun (Van Heuverswyn *et al.*, 2006; Plantier *et al.*, 2009). Les liens phylogénétiques existant entre les souches de SIVcpz*Ptt*, SIVgor et les souches de VIH-1, montrent que les chimpanzés sont le réservoir originel des souches de SIV retrouvés chez les gorilles et les Hommes (Takehisa *et al.*, 2009). Toutefois, les ancêtres des VIH-1 des groupe O et P restent incertains : soit le

chimpanzé a transmis de manière indirecte la souche de SIVgor à l'Homme, le gorille représentant un hôte intermédiaire suite à une transmission inter-espèce de SIV des chimpanzés aux gorilles ; soit le chimpanzé a transmis de manière directe le SIVgor à l'Homme ainsi qu'au gorille (Neel *et al.*, 2010; Takehisa *et al.*, 2009) (**Figure 7**).

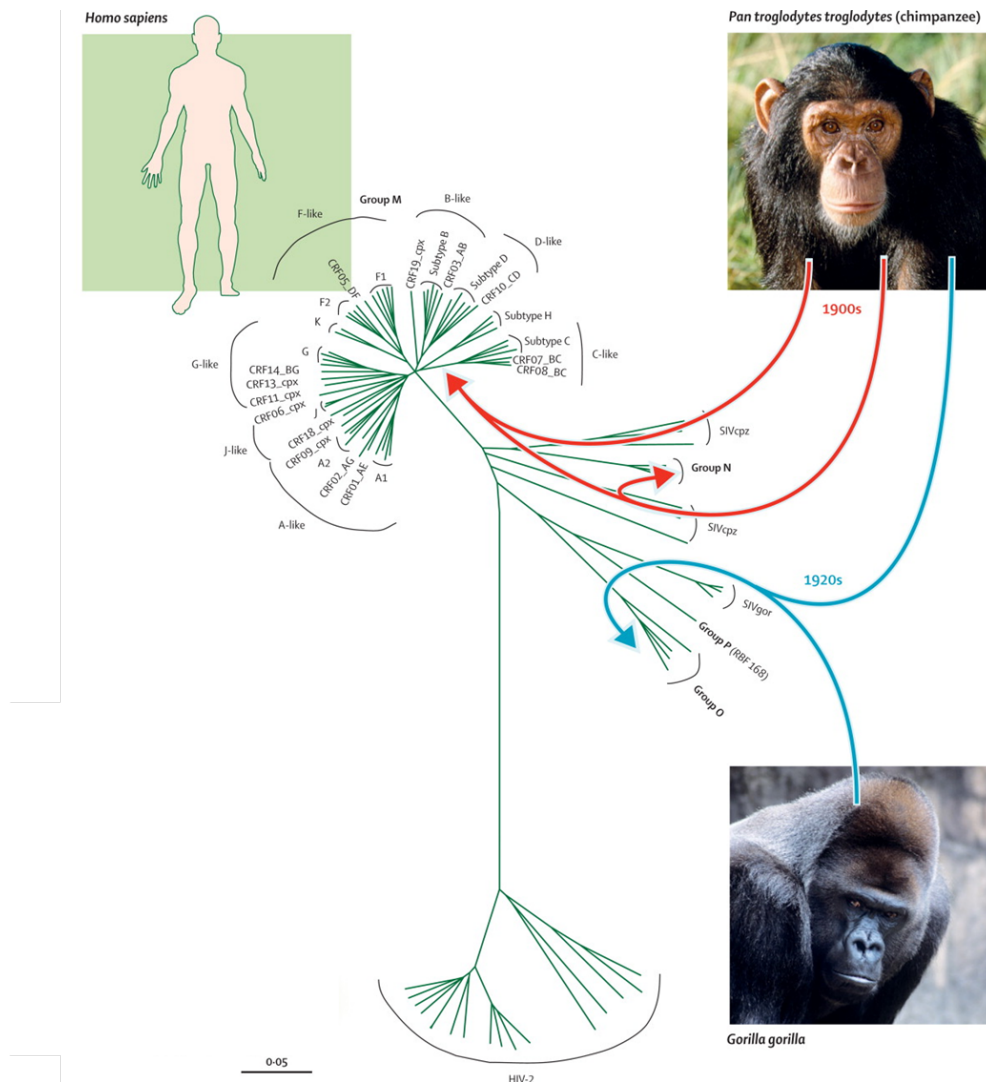


Figure 7. Représentation phylogénétique des groupes M, N, O et P du VIH-1, et transmission des souches simiennes de SIVcpzPtt et SIVgor à l'Homme. Les quatre groupes M, N, O et P du VIH-1 résultent de quatre franchissements d'espèce indépendants à l'Homme de souches de SIVcpzPtt infectant les chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* et de SIVgor infectant les gorilles de la sous-espèce *Gorilla gorilla gorilla* (d'après Tebit & Arts, 2011).

I.6- Diversité génétique du VIH-1

L'extraordinaire diversité du VIH-1 est illustrée aussi bien par les nombreux sous-types et formes recombinantes circulant à l'échelle de la planète que par la multiplicité de variants viraux génétiquement très proches constituant les « quasi-espèces » à l'échelle d'un individu. En effet, chez un seul individu, la diversité génétique du VIH-1 générée après six années d'infection est supérieure à celle des virus de la grippe A sur la planète en une année (Korber *et al.*, 2001a). Cette diversité génétique, associée à l'évolution rapide du virus en réponse aux pressions de sélection exercées par le système immunitaire et/ou aux thérapeutiques antirétrovirales, résulte de plusieurs mécanismes.

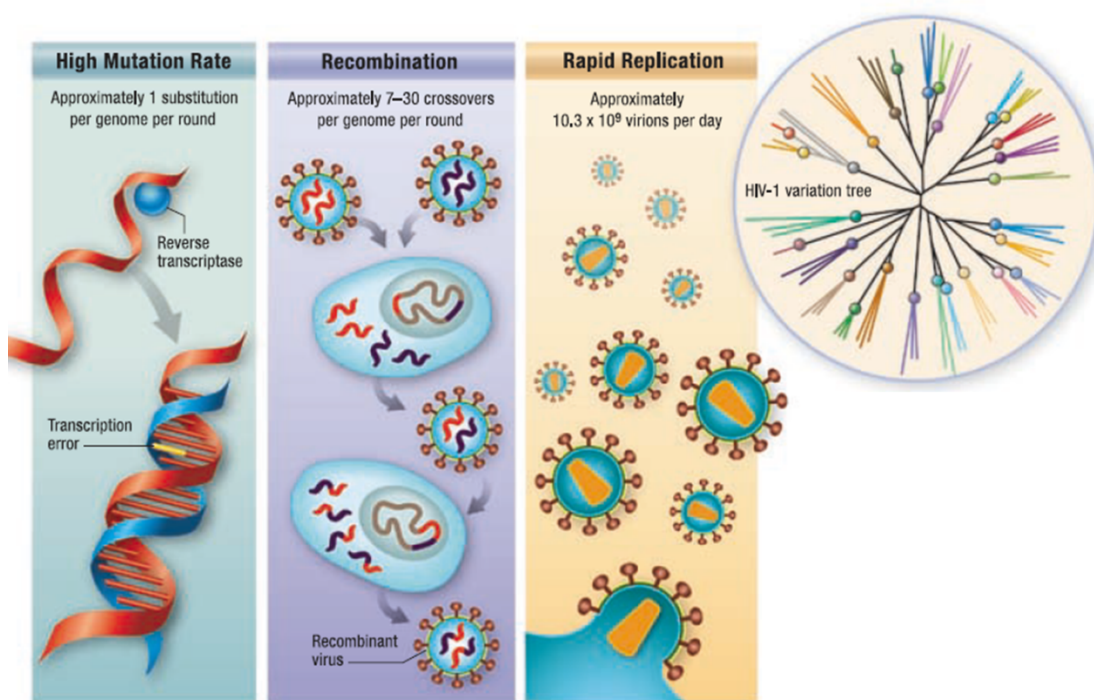


Figure 8. Mécanismes de diversité du VIH-1. La diversité génétique du VIH-1 résulte de trois mécanismes : le haut taux de mutations introduit lors de la rétro-transcription de l'ARN viral, le phénomène de recombinaison lorsqu'une cellule est co-infectée par deux virions, et le fort taux de réplication du VIH-1 au sein des cellules infectées (d'après IAVI blueprint 2006).

▪ Faible fidélité de la transcriptase inverse

Contrairement aux virus à ADN, la transcriptase inverse des virus à ARN est dépourvue d'activité correctrice 3' – 5' exonucléase. Le manque de fidélité de la transcriptase inverse induit un taux élevé d'erreurs lors de la rétro-transcription de l'ARN viral de l'ordre de $3,5 \times 10^{-5}$ à $5,4 \times 10^{-5}$ mutations par base et par cycle réplicatif (Gao *et al.*, 2004; Mansky & Temin,

1995). Le génome du VIH-1 étant constitué de 10^4 bases, chaque provirus généré diffère par une mutation au sein du génome viral (**Figure 8**).

- **Capacité répliquative élevée**

Le taux de réplication élevé du VIH-1 augmente la probabilité de générer des quasi-espèces virales. En effet, le taux de production viral est approximativement de 10^{10} virions produits par jour au sein d'un individu (Ho *et al.*, 1995) (**Figure 8**). Ce taux de réplication élevé, associé aux mutations induites par la transcriptase inverse, génère une extraordinaire diversité génétique de la population virale présente au sein d'un individu.

- **Phénomène de recombinaison**

Le mécanisme de recombinaison est observé lorsqu'une cellule est co-infectée par deux virions du VIH-1 génétiquement distincts. La recombinaison entre deux virus de même sous-type est appelée recombinaison intra-sous-type, alors que la recombinaison entre deux virus de sous-type différent est appelée recombinaison inter-sous-type. Lors de l'assemblage, les brins d'ARN des différents virus peuvent être associés au sein du même virion, aboutissant à la production d'une particule virale hétérozygote. Lors de l'infection d'une nouvelle cellule par ces virus hétérozygotes, les deux brins d'ARN peuvent être recombinés par la transcriptase inverse, du fait des « sauts » effectués par l'enzyme virale au cours de la rétro-transcription entre les deux molécules d'ARN parental, générant ainsi la synthèse d'ADN proviraux recombinants donnant naissance à de nouveaux virus mosaïques (Onafuwa-Nuga & Telesnitsky, 2009; Ramirez *et al.*, 2008) (**Figure 8**).

I.7- Physiopathologie de l'infection à VIH-1

Le VIH se transmet par échanges de fluides biologiques d'une personne infectée à un individu sain. Le virus peut être transmis chez l'adulte par voie sexuelle (80% des infections) ainsi que par voie sanguine (20% des infections) (Cohen *et al.*, 2011). La transmission mère-enfant est la principale cause d'infection à VIH-1 chez l'enfant.

▪ Infection mucale du VIH-1

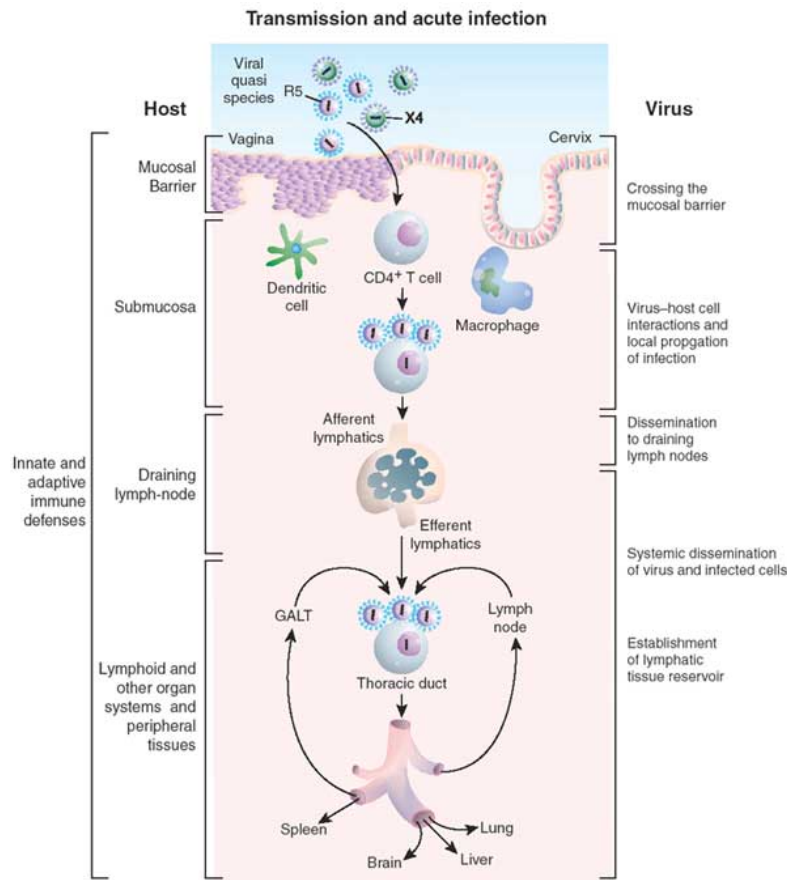


Figure 9. Transmission sexuelle chez la femme et phase aiguë d'infection. Le VIH-1 traverse la barrière mucale pour atteindre et infecter les cellules du système immunitaire muqueux. Le virus est ensuite disséminé aux organes lymphoïdes puis va ensuite atteindre le canal thoracique par les vaisseaux lymphatiques efférents pour être propagé par voie systémique dans l'organisme (Pope & Haase, 2003)

A l'échelle mondiale, la transmission du VIH-1 se fait essentiellement au niveau des muqueuses du tractus génital et du tractus gastro-intestinal à la suite de rapports sexuels. La transmission sexuelle chez la femme et la phase aiguë de l'infection sont schématisées dans la **figure 9**. Le virus, sous forme de particules libres ou de cellules infectées, présent dans les sécrétions, peut franchir la barrière mucale constituée d'épithélium pluristratifié (anus, exocol, vagin et pénis) ou d'une couche monocellulaire basale (rectum et endocol) (Hladik & McElrath, 2008). La pénétration du virus à travers les muqueuses peut se faire via différents mécanismes tels que la transcytose, l'endocytose suivie de l'exocytose, par contact avec les cellules de Langerhans présentes au niveau de l'épithélium stratifié, ou par simple pénétration à travers des brèches causées par des microlésions (Shattock & Moore, 2003). Le virus atteint ainsi les cellules du système immunitaire muqueux telles que les macrophages, les cellules T CD4⁺ et les cellules dendritiques (Hladik & McElrath, 2008; Pope & Haase, 2003). Ces

cellules expriment à leur surface les récepteurs CD4, CCR5 et à un moindre niveau le CXCR4 (Hladik & McElrath, 2008).

Lors de la phase aiguë de l'infection, le virus est disséminé aux organes lymphoïdes et une intense réplication virale est observée 3 à 6 jours après exposition (Cohen *et al.*, 2011). Cette réplication est suivie d'une forte déplétion des cellules T CD4⁺ présentes au niveau des tissus lymphoïdes, et plus particulièrement au niveau du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (*GALT: Gut-associated lymphoid tissue*) (Cicala *et al.*, 2011; Haase, 2005; Mehandru *et al.*, 2007). Cette zone est riche en cellule T CD4⁺, comptant plus de 60 % de lymphocytes T totaux de l'organisme (Douek *et al.*, 2003).

Le virus est disséminé dans l'organisme jusqu'aux organes lymphoïdes via les cellules dendritiques et les cellules T CD4⁺ α4β7⁺. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes. Une fois l'antigène rencontré, ces cellules migrent vers les organes lymphoïdes où elles le présentent aux cellules T. Ces cellules, CD4⁺ et CCR5⁺, peuvent être infectées par le VIH-1 et conduire à la production de nouvelles particules virales bien que la fréquence d'infection soit plus faible que celle des cellules T (Wu & KewalRamani, 2006). Les cellules dendritiques présentent également à leur surface une lectine nommée DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non integrin), qui a la capacité de se lier aux glycanes présents sur l'enveloppe du VIH-1, conduisant ainsi à l'endocytose des virions (Tsegaye & Pöhlmann, 2010). Une fois activées, les cellules dendritiques remplissent leur rôle naturel et migrent vers les organes lymphoïdes. Le VIH-1 détourne donc la migration des cellules dendritiques pour être disséminé dans l'organisme (Tsegaye & Pöhlmann, 2010). Le virus infecte alors les lymphocytes T CD4⁺ adjacents via une infection impliquant la mise en place d'une synapse virologique (Wu & KewalRamani, 2006) (**Figure 10**).

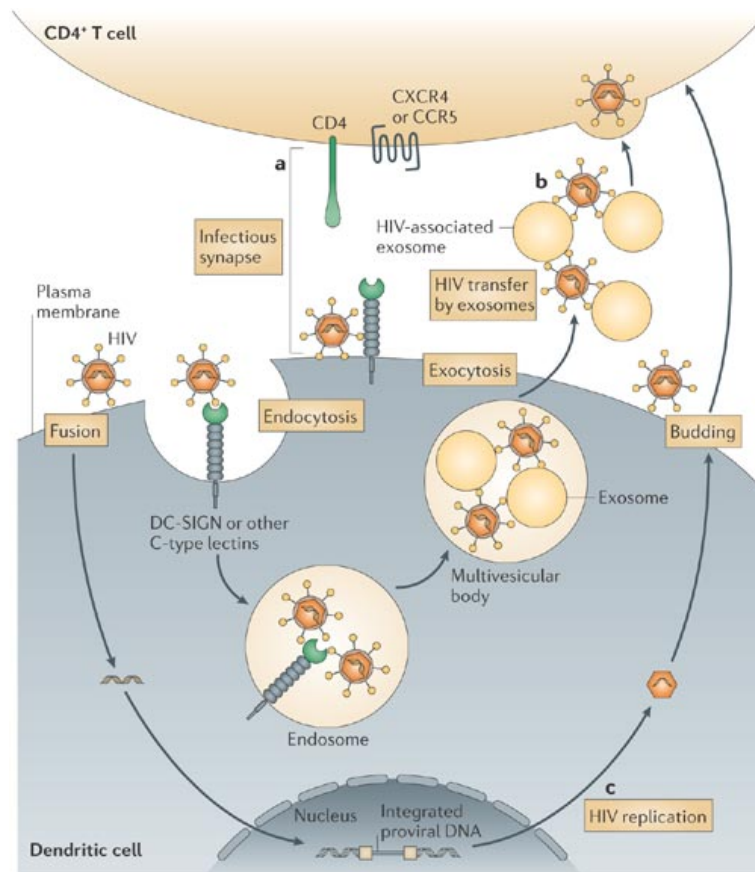


Figure 10. Mécanismes de transmission du VIH-1 via les cellules dendritiques. Une cellule dendritique infectée établie une synapse virologique avec une cellule T CD4⁺ cible. La cellule cible peut être infectée d'une part via le virus fixé au DC-SIGN (a) ou après endocytose du VIH-1 au sein de la cellule dendritique (b), ou d'autre part après infection de la cellule dendritique avec production de nouvelles particules virales (c) (Wu & KewalRamani, 2006).

Une population de cellules T CD4⁺ CCR5⁺ exprime à leur surface l'intégrine $\alpha 4\beta 7$. Ces cellules T sont localisées au niveau de la muqueuse vaginale et des tissus du GALT (Arthos *et al.*, 2008; Cicala *et al.*, 2011; Haase, 2005). Les virus bourgeonnant à la surface de cellules infectées sont capables d'interagir avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ à la surface des cellules T cibles via la sous-unité gp120 du VIH-1. Cette interaction induit un signal de migration vers les zones riche en cellules T du GALT, et d'autre part l'expression de l'intégrine LFA-1 à la surface des cellules $\alpha 4\beta 7^{+}$ cibles. Cette intégrine facilite la formation d'une synapse virologique entraînant la dissémination du virus de cellule à cellule (Cicala *et al.*, 2011) (**Figure 11**).

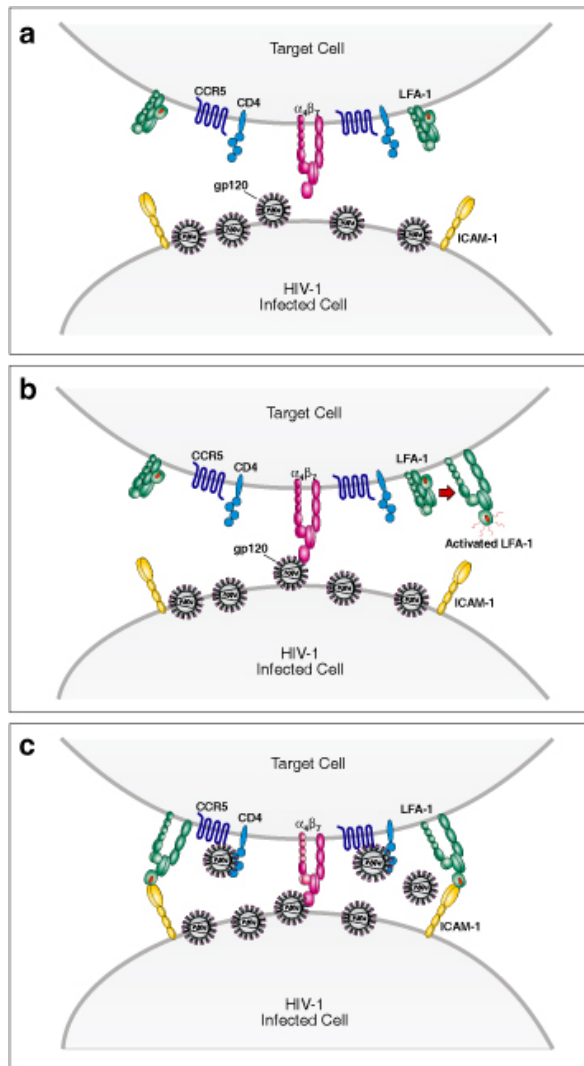


Figure 11. Formation d'une synapse virologique suite à l'interaction entre l'enveloppe du VIH-1 et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$. (a) une cellule infectée entre en contact avec une cellule T cible $\alpha_4\beta_7^+$. (b) l'interaction entre la gp120 du VIH-1 et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ de la cellule cible entraîne l'activation de l'intégrine LFA-1 à la surface de la cellule cible. (c) LFA-1 se lie à son ligand ICAM-1 présent à la surface de la cellule infectée, entraînant la formation d'une synapse virologique (Cicala *et al.*, 2011).

▪ Physiopathologie de l'infection à VIH-1

L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1 peut être divisée en trois phases successives : une phase de primo-infection, suivie d'une phase asymptomatique ou de latence clinique, et une phase correspondant à l'apparition du stade SIDA (Grossman *et al.*, 2006; Weber, 2001).

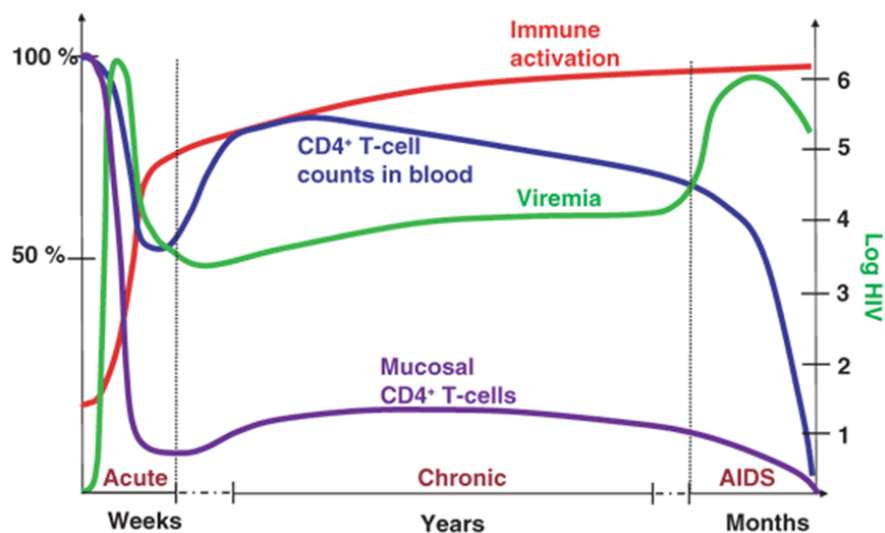


Figure 12. Progression de l'infection par le VIH-1. Au cours de l'infection aiguë, le virus se réplique intensément, conduisant à une chute des cellules T CD4⁺ dans le sang et à une déplétion des cellules T CD4⁺ des muqueuses. L'activation du système immunitaire durant cette phase va permettre de réduire la charge virale et de rétablir le nombre de cellule T CD4⁺ dans le sang périphérique alors que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ muqueux se maintient à un niveau extrêmement faible. Lors de la phase chronique de l'infection, un équilibre s'établit entre la virémie et le nombre de cellule T CD4⁺. Cet équilibre entre infection et contrôle peut durer 10 ans, jusqu'à l'entrée dans la phase SIDA où la charge virale augmente de manière exponentielle alors que le nombre de cellule T dans le sang chute considérablement. Cette lymphopénie s'associe généralement à l'apparition de maladies opportunistes (Grossman *et al.*, 2006).

- La primo-infection

La phase de primo-infection, ou phase aiguë, suit directement la contamination d'un individu par le virus. Cette phase correspond à une réplication intense du virus dans les organes lymphoïdes associée à une diminution plus ou moins importante du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants ainsi qu'à une déplétion des cellules T CD4⁺ du GALT. Elle peut être accompagnée de symptômes cliniques non spécifiques évoquant un syndrome grippal ou un syndrome de type mononucléose. Le virus se multiplie intensément dans le tissu lymphoïde et devient détectable dans le plasma après 7 - 10 jours (Cohen *et al.*, 2011). Le pic de virémie est suivi par la mise en évidence d'une réponse cellulaire T CD8⁺, et les premiers anticorps anti-VIH sont détectés par test immunoenzymatique (ELISA) 3 semaines après la contamination (Cohen *et al.*, 2011).

Le pic de virémie est régulièrement associé à une diminution transitoire du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants dans le sang. Lorsque la charge virale plasmatique est

contrôlée, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ remonte mais reste à un niveau légèrement inférieur à celui d'avant l'infection (Grossman *et al.*, 2006; Weber, 2001) (**Figure 12**).

- La phase asymptomatique

La primo-infection est suivie par une phase de latence clinique, ou phase asymptomatique, d'une durée variable selon les individus : une à trois années pour les individus dits « progressseurs rapides » ou plus de dix années chez des individus qualifiés d'asymptomatiques à long terme (ALT). Cette phase est caractérisée par une stabilisation de la charge virale plasmatique et le maintien du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants, qui tendent cependant progressivement à diminuer (Weber, 2001). Durant cette phase de latence, le virus se réplique continuellement dans les organes lymphoïdes. Il se crée alors un équilibre entre le taux de réplication du virus, l'élimination des cellules T CD4⁺ infectées et le renouvellement de ces cellules (**Figure 12**).

- La phase SIDA

Lors de la phase tardive, correspondant au stade SIDA, l'équilibre entre infection et contrôle est rompu. Cette phase est caractérisée par une chute rapide du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et par une augmentation de la charge virale. Des maladies opportunistes d'origine bactérienne, fongique, parasitaire ou encore virale, ainsi que des complications tumorales telles que le sarcome de Kaposi sont alors observées, conduisant à la mort des patients en l'absence de traitement (**Figure 12**).

II- Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1

Les glycoprotéines d'enveloppe, exposées à la surface du VIH, sont formées de trimères d'hétérodimères constitués d'une sous-unité de surface, la gp120, et d'une sous-unité transmembranaire, la gp41 (Checkley *et al.*, 2011; Wyatt *et al.*, 1998). Ces deux glycoprotéines jouent un rôle important dans les étapes précoces de l'infection en initiant l'entrée du virus dans les cellules et sont les cibles des anticorps neutralisants.

II.1- Synthèse et glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe

La traduction du gène *env* donne naissance à un précurseur polyprotéique, la gp160, de 833 à 900 acides aminés. Ce précurseur va subir de nombreuses étapes de glycosylation et de maturation à travers le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi, permettant ainsi le bon repliement et la stabilité conformationnelle des glycoprotéines d'enveloppe (Pantophlet & Burton, 2006). Les glycoprotéines d'enveloppe sont fortement glycosylées. Ces glycanes proviennent essentiellement de la N-glycosylation avec une contribution mineure de la O-glycosylation (Raska & Novak, 2010). Les positions des N-glycanes, définies par les séquences consensus de glycosylation Asn-X-Ser/Thr (où X ne peut être une proline) sont directement codées par le génome viral et sont relativement bien conservées au sein des différents isolats et sous-types (Scanlan *et al.*, 2007).

Le précurseur gp160 néosynthétisé est transporté par la protéine de transport Sec61 dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où des chaînes glycosidiques sont ajoutées (Scanlan *et al.*, 2007). Une fois dans le réticulum endoplasmique, le précurseur polyprotéique va subir des étapes de maturation avec notamment, le repliement de la protéine, la formation des différentes liaisons disulfures, ainsi que l'oligomérisation sous forme de trimère. Au niveau de l'appareil de Golgi, les motifs glycosidiques vont être soumis à des modifications par plusieurs enzymes cellulaires, générant des N-glycanes de type hybrides, complexes ou oligomannoses (Helenius & Aebi, 2001, 2004; Scanlan *et al.*, 2007) (**Figure 13**). Les glycanes de l'enveloppe virale sont principalement de type oligomannoses (Bonomelli *et al.*, 2011; Doores *et al.*, 2010a). La glycoprotéine qui en résulte, d'une masse moléculaire d'environ 160 kiloDalton (kDa), est clivée au niveau de la séquence conservée REKR₅₁₁ par une protéase cellulaire, la furine, ou par d'autres protéases de type furine, en deux

glycoprotéines, la gp120 et la gp41 (Bahbouhi *et al.*, 2002; Freed *et al.*, 1989; Pantophlet & Burton, 2006). Le clivage protéolytique de la gp160 est nécessaire pour l'activation de l'activité fusogénique de l'enveloppe et est donc essentiel pour l'infectivité virale (Checkley *et al.*, 2011). La gp120 et la gp41 sont associées de façon non covalente pour former des trimères d'hétérodimères gp120/gp41, qui sont par la suite transportés et ancrés dans la membrane cellulaire. Lors du bourgeonnement viral, ces trimères sont incorporés dans l'enveloppe virale et sont exposés à la surface du virus, avec en moyenne 14 ± 7 spicules d'enveloppe par virions (Zhu *et al.*, 2003, 2006).

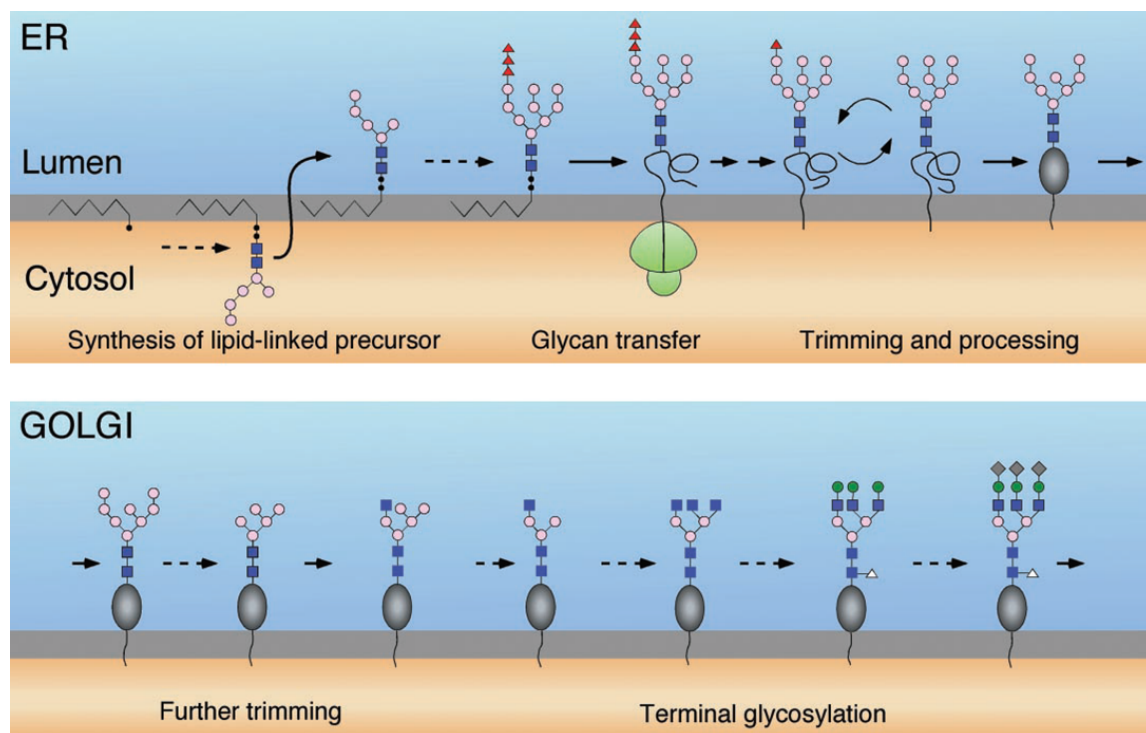


Figure 13. N-glycosylation du précurseur gp160. Dans le réticulum endoplasmique, le précurseur polyprotéique va subir des étapes de maturation avec des repliements protéiques, la formation de liaisons disulfures et des modifications au niveau des sucres de la chaîne glycosidique. Dans l'appareil de Golgi, les motifs glycosidiques vont subir de nombreuses modifications par plusieurs enzymes cellulaires. Les différents sucres composant la chaîne glycosidique sont représentés : N-acétylglucosamine (carré bleu), mannose (cercle rose), glucose (triangle rouge), galactose (cercle vert), fucose (triangle blanc) et acide sialique (losange gris) (Helenius & Aebi, 2001).

II.2- Structure des glycoprotéines d'enveloppe

II.2.1- Structure de la gp120

La gp120 est une protéine extracellulaire de 120 kDa hautement glycosylée, la moitié de la masse moléculaire provenant de la N-glycosylation (Leonard *et al.*, 1990). Le nombre de sites potentiels de N-glycosylation (PNGS) sur la gp120 varie entre 18 et 33 selon les virus, avec une moyenne de 25 (Korber *et al.*, 2001b; Zhang *et al.*, 2004). L'analyse de la diversité des séquences protéiques de la gp120 ont permis d'identifier cinq régions conservées (C1 à C5) séparées par cinq régions variables (V1 à V5) (Starcich *et al.*, 1986; Willey *et al.*, 1986) (**Figure 14**). Les quatre premières régions variables, V1 à V4, forment des boucles exposées à la surface contenant à leur base un pont disulfure. La boucle V5 se présente aussi sous forme de boucle mais est dépourvue de liaison disulfure. Les régions conservées de la gp120 forment des structures discontinues essentielles dans l'interaction avec la glycoprotéine transmembranaire et les récepteurs cellulaires spécifiques (Kwong *et al.*, 1998).

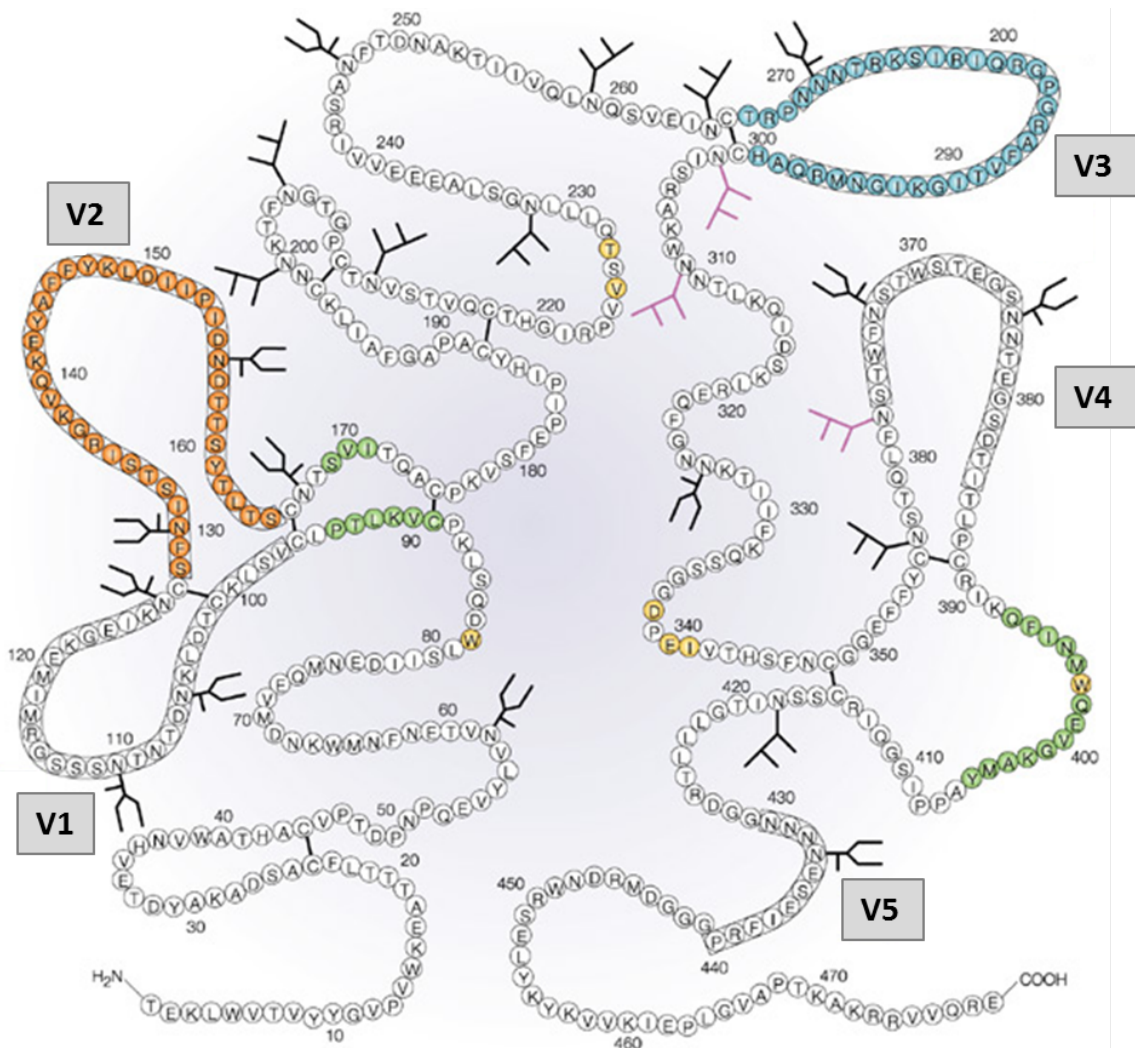


Figure 14. Structure secondaire de la gp120. Les boucles variables V1 à V5 sont encadrées. Les sites de N-glycosylation sont indiqués (chaînes ramifiées), ainsi que les cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures. Les épitopes de la gp120 qui induisent des anticorps neutralisants sont colorés : le site de liaison au CD4 (cercle jaune), l'épitope CD4-induit (cercle vert), la boucle V2 (orange) et la boucle V3 (bleu) (Zolla-Pazner. 2004).

▪ Structure cristallographique de la gp120 du VIH-1 et du SIV

La structure cristallographique de la gp120 entière n'a pas pu être élucidée. Seules différentes structures cristallographiques du coeur de la gp120 du VIH-1 associée au CD4 soluble et/ou à un anticorps ont été obtenues. La stabilisation des cristaux a nécessité la déglycosylation de la gp120, la délétion des boucles variables V1, V2 et V3, ainsi que la délétion des segments N- et C- terminaux (Chen *et al.*, 2009; Kwong *et al.*, 2000, 1998; Zhou *et al.*, 2007). Deux autres structures de la gp120 avec la boucle variable V3 (Huang *et al.*, 2005), et les segments N- et C- terminaux (Pancera *et al.*, 2010a) ont été décrites liées au CD4 et à un anticorps anti-épitope CD4 induit (épitope de la gp120 exposé uniquement après interaction avec le CD4).

L'analyse des cristaux obtenus a montré que la gp120 possédait une structure moléculaire unique, comprenant un domaine interne et un domaine externe reliés par un feuillet β inter-domaines appelé feuillet de liaison (« bridging sheet») (Kwong *et al.*, 1998). Ces deux domaines reflètent l'orientation des monomères de gp120 au sein de la structure trimérique (**Figure 15**). Le domaine interne, situé dans la zone interne du trimère, est formé des régions C1 et C5 impliquées dans l'interaction de la gp120 avec la gp41 et est dépourvu de glycanes (Kwong *et al.*, 1998; Pancera *et al.*, 2010a; Wyatt *et al.*, 1998). Le domaine externe, au contraire, est exposé à la surface du spicule d'enveloppe et contient la majorité des motifs glucidiques diminuant ainsi l'immunogénicité de la gp120. Les boucles variables V1/V2 émanent du domaine interne alors que les boucles V3, V4 et V5 proviennent du domaine externe. Le feuillet de liaison est composé de 4 feuillets β antiparallèles, deux provenant du domaine interne ($\beta 2$ - $\beta 3$) et deux provenant du domaine externe ($\beta 20$ - $\beta 21$) (Pantophlet & Burton, 2006).

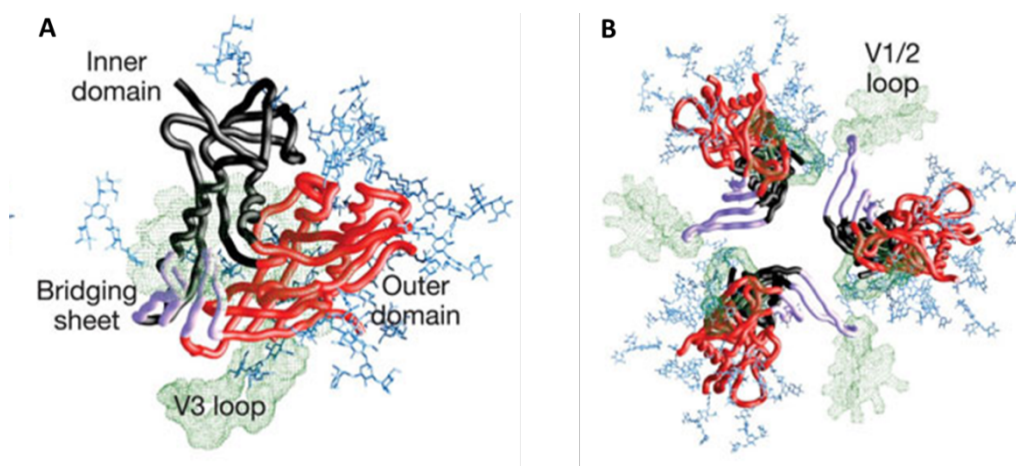


Figure 15. Structure cristallographique du monomère (A) et trimère (B) de la gp120 liée au CD4. Le domaine interne est représenté en noir, le domaine externe en rouge et le feuillet de liaison en violet. La position des boucles variables V1/V2 et V3 est représentée en vert et les glycanes en bleu (d'après Kwong *et al.*, 2002).

A ce jour, la structure cristallographique de la gp120 du VIH-1 dans sa conformation non liée au CD4 n'a pas été déterminée. Toutefois, la structure cristallographique du coeur de la gp120 d'une souche de SIV, SIVmac 32H, dans sa conformation native non liée au CD4 a été résolue. Cette structure glycosylée est dépourvue des boucles V1, V2 et V3 et des segments N- et C- terminaux (Chen *et al.*, 2005). Du fait de la forte homologie de séquences de la gp120 entre les souches SIVmac 32H du SIV et HxB2 du VIH-1 (35% de résidus identiques

et 70% de résidus similaires), la structure du cœur de la gp120 du SIVmac 32H peut être comparée avec celles obtenues de la gp120 du VIH-1 liée au CD4 (Chen *et al.*, 2005). La comparaison de ces structures a mis en évidence des modifications conformationnelles importantes induites par la fixation de la gp120 au récepteur CD4 (**Figure 16**). En effet, alors que le domaine externe présente une structure similaire dans les deux conformations, le domaine interne et le feuillet de liaison subissent de nombreux changements conformationnels. Suite à l'interaction de la gp120 au récepteur CD4, le domaine interne est repositionné entraînant l'exposition du site de liaison au co-récepteur ainsi que le déclenchement de la première étape du processus de fusion. Le feuillet de liaison est également contraint à des changements conformationnels. Dans la conformation de la gp120 non liée au CD4, les quatre feuillets β constituant le feuillet de liaison sont séparés en deux paires ($\beta 2$ - $\beta 3$ et $\beta 20$ - $\beta 21$) distantes d'environ 20 Å, alors que la fixation au récepteur CD4 entraîne un regroupement de ces feuillets en une structure compacte (**Figure 16**) (Pantophlet & Burton, 2006). Cependant, la disposition du feuillet de liaison obtenu à partir de la structure de la gp120 sans attachement au CD4 semble être une des nombreuses conformations que ce domaine peut adopter. La modélisation moléculaire de cette structure démontre une oscillation des feuillets $\beta 2$ - $\beta 3$ entre les conformations obtenues avec et sans attachement au CD4 (Pantophlet & Burton, 2006).

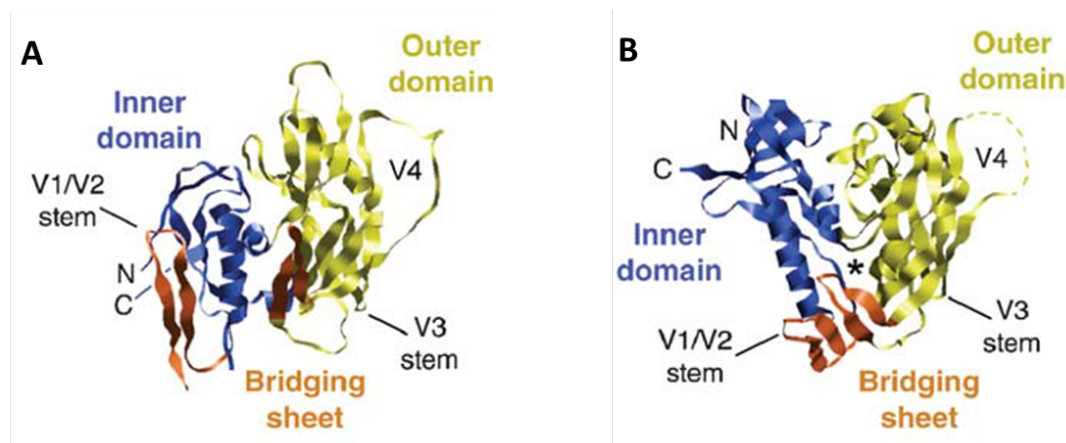


Figure 16. Comparaison de la structure cristallographique de la gp120 liée ou non au CD4. A. Structure de la gp120 du SIV (SIVmac 32H) non liée au CD4. **B.** Structure de la gp120 du VIH-1 (HxB2) complexée au CD4. Les domaines interne et externe sont colorés en bleu et jaune respectivement, et le feuillet de liaison est coloré en rouge. La localisation des régions variables V1/V2, V3 et V4 est précisée (Pantophlet & Burton, 2006).

▪ Structure des boucles V1/V2

Le domaine V1/V2, dont l'importance dans les propriétés antigéniques et fonctionnelles de la gp120 a particulièrement été pointée ces dernières années, y compris dans mes travaux de thèse, est le domaine le plus variable en terme de longueur (50 à 90 acides aminés) et de sites potentiels de N-glycosylation de la gp120 (Checkley *et al.*, 2011). Les boucles V1/V2 seraient situées au sommet du spicule d'enveloppe et protégeraient la boucle variable V3, le site de liaison au co-récepteur et le site de liaison au CD4 (Harris *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008, 2011a; Pantophlet & Burton, 2006; Rusert *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010a). La structure du domaine V1/V2 de la gp120 a récemment été décrite pour la première fois à la surface d'un « scaffold » en association avec l'anticorps monoclonal humain largement neutralisant PG9 (Cf Partie III.2.4). Le domaine V1/V2 présente une structure à quatre brins β notés A à D, reliés par deux ponts disulfure inter-brins. La boucle V1 correspond aux résidus connectant les brins A et B, et la boucle V2 aux résidus entre les brins C et D (McLellan *et al.*, 2011) (**Figure 17**). La gp120 a la capacité de se lier à l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$ présente à la surface de lymphocytes T CD4⁺ du GALT via un tripeptide Leu-Asp-Val localisé dans la boucle V2 (Arthos *et al.*, 2008).

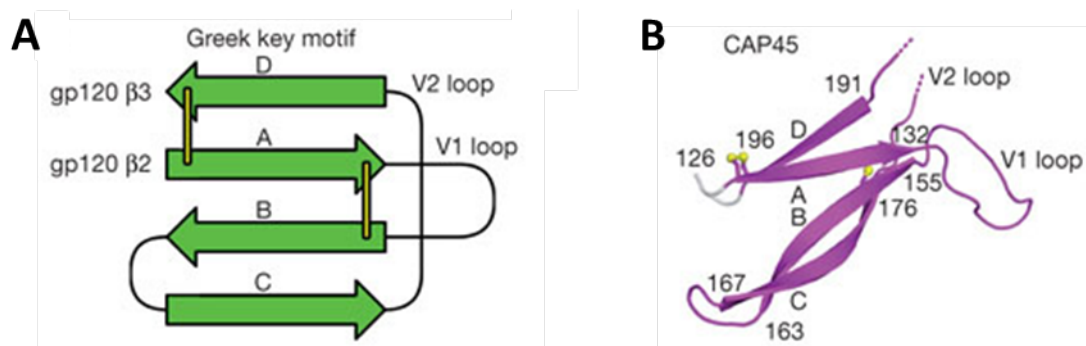
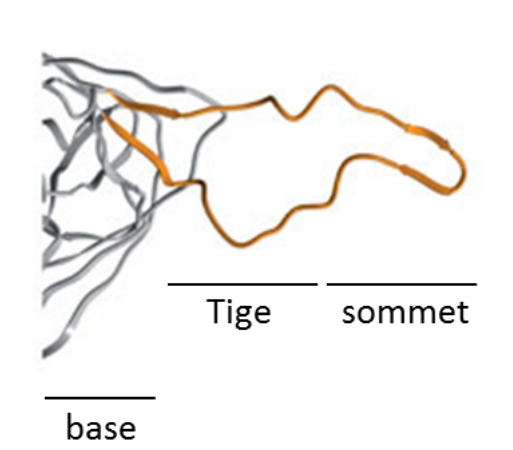


Figure 17. Structure du domaine V1/V2 de la gp120. **A.** Représentation schématique du domaine V1/V2. Les brins β sont représentés sous forme de flèches et les ponts disulfures en traits jaunes. **B.** Représentation du domaine V1/V2 (résidus 126 à 196) de la souche CAP45. Les ponts disulfures sont représentés par des cercles jaunes (McLellan *et al.*, 2011).

▪ Structure de la boucle V3

La région variable V3 joue un rôle essentiel dans les interactions virus-corécepteurs ainsi que dans le tropisme viral (Cardozo *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 1991; Labrosse *et al.*, 2001; Shioda *et al.*, 1992). Elle est constituée de 35 acides aminés, est glycosylée et forme une boucle émanant du domaine externe, créée par un pont disulfure entre deux cystéines conservées

(Hartley *et al.*, 2005). La structure du cœur de la gp120 avec la boucle V3, liée au CD4 et à l'anticorps anti-CD4 induit X5 a été décrite. La boucle V3 présente une structure en feuillet β , et peut être divisée en trois régions : une base, située à proximité du cœur de la gp120 et formée par le pont disulfure, une tige flexible et un sommet avec à son extrémité la séquence très conservée GPGR (Huang *et al.*, 2005) (**Figure 18**).



▪ Antigénicité et immunogénicité de la gp120

La gp120 peut être divisée en trois régions définies par leur liaison aux anticorps nommées face neutralisante, face non-neutralisante et face silencieuse (Poignard *et al.*, 2001; Wyatt & Sodroski, 1998; Wyatt *et al.*, 1998) (**Figure 19**).

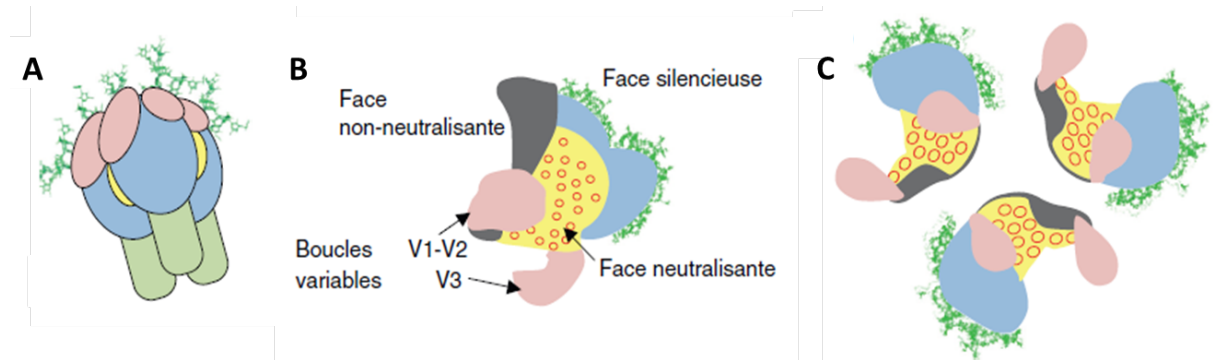


Figure 19. Immunogénicité de la gp120. **A.** Représentation d'un trimère de glycoprotéine d'enveloppe. Vert pâle : gp41 ; bleu : face silencieuse ; jaune : face neutralisante ; rose : boucles variables V1/V2 et V3 ; vert foncé : chaînes glycaniques. **B.** Représentation schématisée des différentes régions antigéniques d'un monomère de gp120. Gris : face non-neutralisante ; autres couleurs : idem que A. **C.** Représentation schématisée des différentes régions antigéniques de la gp120 associée en trimères (Adapté de Braibant *et al.*, 2011 et Kwong *et al.*, 2002)

- La face neutralisante

La face neutralisante regroupe des régions conservées de la gp120 situées au niveau des sites de liaison au récepteur CD4 et aux co-récepteurs. Cette région représente un point faible du virus car la conservation et l'exposition de ces sites de contact sont essentielles pour l'infection des cellules cibles (Poignard *et al.*, 2001).

- La face non-neutralisante

La face non-neutralisante correspond au domaine interne très conservé de la gp120. Dès les phases précoces de l'infection, les individus infectés développent une réponse anticorps dirigée contre cette face. Différentes formes de trimères non fonctionnels à la surface du virion résultant très probablement de l'instabilité des interactions entre les glycoprotéines voire le relargage de monomères de gp120 ont été décrites (Moore *et al.*, 2006). La face non-neutralisante est alors exposée au système immunitaire entraînant une forte réponse anticorps non-neutralisants. Au sein du trimère d'enveloppe gp120-gp41, la face non-neutralisante est orientée vers l'intérieur du trimère. Elle n'est donc pas accessible aux anticorps qui n'ont alors aucun pouvoir neutralisant (Poignard *et al.*, 2001).

- La face silencieuse

La face silencieuse est formée par le domaine externe fortement glycosylé. Les motifs glycosidiques du domaine externe forment un bouclier glycanique qui diminue l'exposition des épitopes et contribue à l'échappement du virus aux anticorps neutralisants. Ces glycanes, produits par la machinerie cellulaire, appartiennent au répertoire du « soi » et sont très faiblement immunogènes, d'où le nom de face silencieuse (Poignard *et al.*, 2001).

- Les boucles variables V1/V2 et V3

En plus de ces trois faces « individualisées », les régions variables V1/V2 et V3 présentent une immunogénicité importante. La région V3 a été initialement décrite comme le principal déterminant de neutralisation (PND : principal neutralization determinant) (Javaherian *et al.*, 1990, 1989; LaRosa *et al.*, 1991). La majorité des individus infectés développent des anticorps dirigés contre la boucle V3. De plus, des anticorps dirigés contre la boucle V2 sont également détectés chez 20 à 45% des individus infectés (Zolla-Pazner & Cardozo, 2010). Des études d'immunisation de lapin avec la boucle V3 seule liée à une protéine recombinante

ont mis en évidence l'établissement d'une réponse neutralisante de large spectre pouvant être spécifique de la boucle V3 (Zolla-Pazner *et al.*, 2008, 2009, 2011).

II.2.2- Structure de la gp41

La gp41, protéine transmembranaire de 41 kDa, est impliquée dans l'ancrage des spicules d'enveloppe dans la bicouche lipidique à la surface cellulaire, dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe au sein des particules virales, ainsi que dans la fusion des membranes virale et cellulaire. Contrairement à la gp120, la gp41 présente une structure plus conservée du fait de l'absence de régions variables (Montero *et al.*, 2008). Cette protéine est composée de 345 acides aminés environ et contient 4 à 5 sites de N-glycosylation situés dans l'ectodomaine (Checkley *et al.*, 2011; Montero *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2004). La gp41 est divisée en trois domaines : un domaine extracellulaire N-terminal (ectodomaine), un petit domaine transmembranaire et un long domaine intracellulaire C-terminal (queue cytoplasmique) (Montero *et al.*, 2008) (**Figure 20**).

Le domaine extracellulaire (170 acides aminés) est composé de plusieurs éléments fonctionnels impliqués dans la fusion membranaire : (1) une région hydrophobe située à l'extrémité N-terminale jouant le rôle de peptide de fusion ; (2) deux régions constituées de séquences heptamériques répétées organisées en hélice α situées en position N-terminale (NHR ou HR-1) et C-terminale (CHR ou HR2) ; (3) ces deux régions sont reliées par une boucle hydrophile formée par un pont disulfure contenant à sa base le domaine immunodominant principal. Cette région très conservée est la cible d'anticorps présents chez tout patient infecté par le VIH et constitue l'antigène principal des trousse de dépistage des anticorps anti-VIH (Baillou *et al.*, 1991; Norrby *et al.*, 1987); (4) une région riche en tryptophane située à l'extrémité C-terminale proche de la membrane virale appelée MPER pour « membrane-proximal external region » (Checkley *et al.*, 2011; Montero *et al.*, 2008) (**Figure 20**).

Le domaine transmembranaire, région hydrophobe de 20 acides aminés, permet l'ancrage de la protéine transmembranaire et, par conséquent, du trimère gp120/gp41, dans la bicouche lipidique à la surface de la cellule hôte.

Le domaine intracellulaire, long de 150 acides aminés, est composé de trois régions hydrophobes organisées en hélice α , nommées LLP-1 (Lentivirus Lytic Peptides 1), LLP-2 et

LLP-3. Ce domaine joue un rôle dans l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe au sein des particules virales (Beaumont *et al.*, 2009; Checkley *et al.*, 2011).

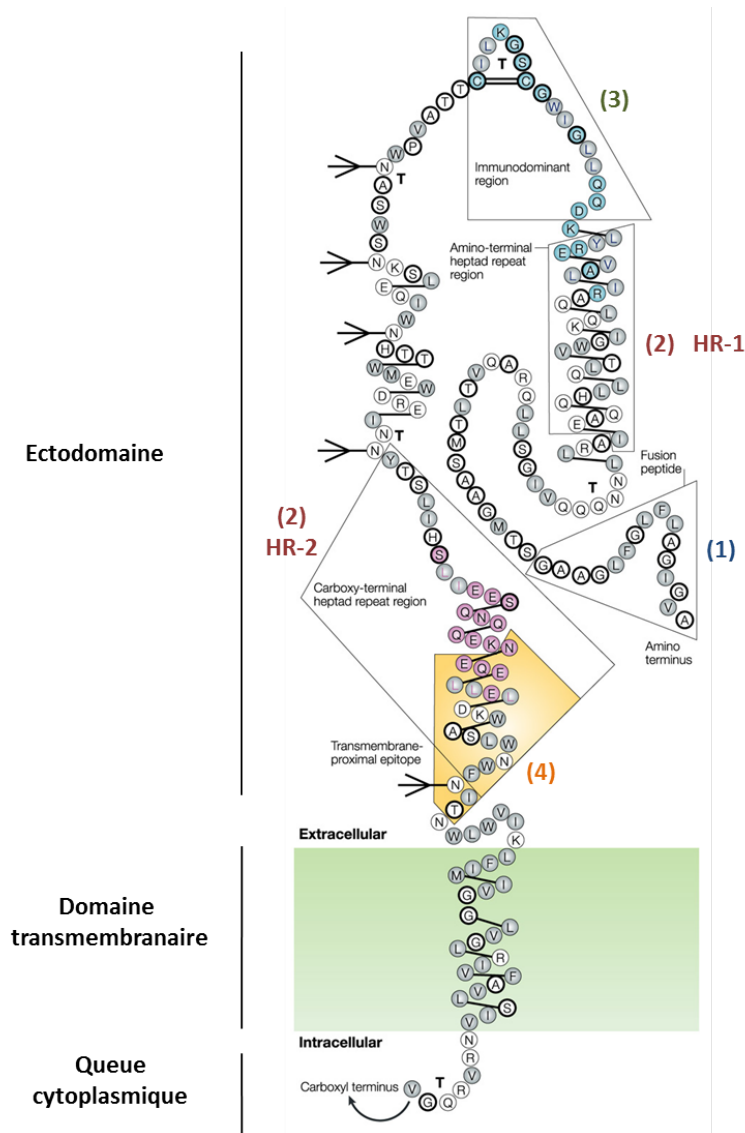


Figure 20. Structure secondaire de la gp41. Les régions encadrées et numérotées de 1 à 4 correspondent aux régions structurales et fonctionnelles de l'ectodomaine de la gp41 : (1) peptide de fusion, (2) séquences heptamériques répétées HR-1 et HR-2, (3) région immunodominante, (4) MPER. Les sites de N-glycosylation sont indiqués sous forme de chaînes ramifiées (d'après Zolla-Pazner, 2004).

La structure cristallographique de l'ectodomaine de la gp41 à l'état « post fusion » a été résolue (Buzon *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Sous forme trimérique, les 3 hélices α HR-2, situées à l'extérieur, interagissent avec les 3 hélices α HR1 pour former un faisceau d'hélices torsadées dans lequel les hélices

HR-2 et HR-1 sont orientées de façon antiparallèle (**Figure 21**). Ces régions sont impliquées dans la fusion des membranes virale et cellulaire.

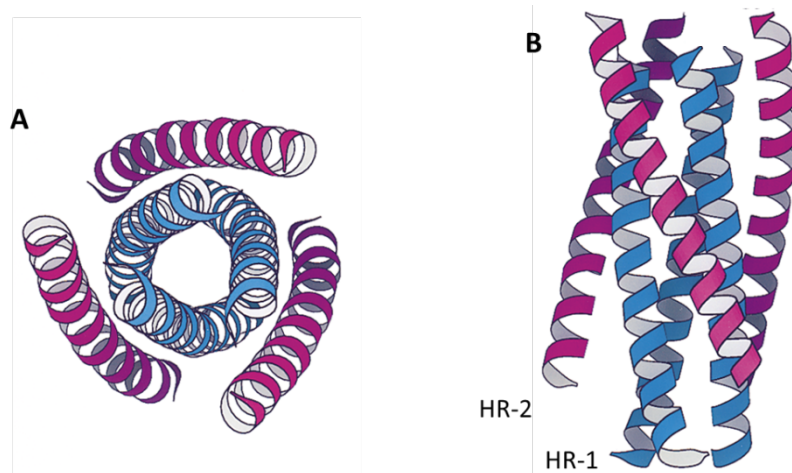


Figure 21. Structure cristallographiques des hélices HR-1 et HR2 de l'ectodomaine de la gp41. Les hélices HR-1 (bleu) et HR-2 (violet) sont représentées en conformation trimérique, vue de dessus (A) et de côté (B) (Chan *et al.*, 1997).

II.3- Modèles de trimères des spicules d'enveloppe du VIH-1 et du SIV

L'analyse tomographique en cryo-microscopie électronique est un nouvel outil d'analyse permettant la reconstruction en trois dimensions de structures pléomorphes telles que des cellules ou des organelles (Lucić *et al.*, 2005; McIntosh *et al.*, 2005; Subramaniam, 2006). Ce nouvel outil de visualisation a permis, d'une part, de confirmer la nature trimérique des spicules d'enveloppe du VIH-1 et du SIV exposés à la surface des virions, et, d'autre part, d'établir des modèles 3D des trimères d'enveloppe du SIV (White *et al.*, 2011, 2010; Zanetti *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006) et du VIH-1 (Harris *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; White *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010a; Zhu *et al.*, 2008).

▪ Distribution des spicules d'enveloppes du VIH-1 et du SIV

La souche MN du VIH-1 et la souche SIVmac239, présentent respectivement 14 ± 7 et 73 ± 25 spicules d'enveloppe réparties sans disposition particulièrement ordonnée sur toute la surface virale. Néanmoins, quelques régions de la surface virale semblent regrouper plusieurs trimères à proximité les uns des autres qui pourrait suggérer des interactions inter-spicules par contact entre les queues cytoplasmiques des gp41 (Zhu *et al.*, 2006) (**Figure 22**). La différence du nombre de spicules d'enveloppe observée entre les souches de SIV et de VIH-1

s'expliquerait par une troncation au niveau de la queue cytoplasmique de la souche SIVmac239 qui entraîne une augmentation du niveau d'expression des glycoprotéines d'enveloppe à la surface virale comparé aux virus présentant une queue cytoplasmique intacte (Zhu *et al.*, 2003, 2006).

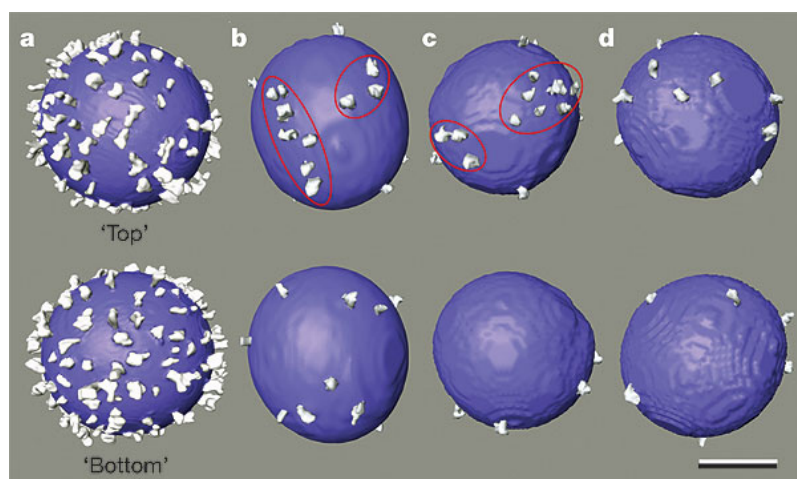


Figure 22. Modélisation de la surface de virions du SIV (a) et du VIH (b-d). Les spicules d'enveloppes sont représentés en blanc. Les deux hémisphères des virions sont nommés « haut / top » et « bas / bottom ». Les cercles rouges représentent des regroupements d'au moins trois spicules (Zhu *et al.*, 2006).

▪ Modélisation du trimère d'enveloppe du SIV

La structure des trimères d'enveloppe du SIV exposés à la surface des virions a été déterminée à partir de deux souches simiennes, SIVmac239 (White *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006) et SIVmneE11S (White *et al.*, 2010; Zanetti *et al.*, 2006). Quatre modélisations tomographiques des spicules d'enveloppe du SIV ont été générées et sont résumées dans le **tableau 1**. La **figure 23** représente les modèles 3D des spicules d'enveloppe du SIV ainsi que les corrélations entre la structure cristallographique de la gp120 et les modélisations tomographiques.

Auteur	Souche de SIV	Modèle 3D	Structure cristallographique
Zhu <i>et al.</i> , 2006	SIVmac239	Modèle en tripode	gp120 du SIV non liée au CD4 (Chen <i>et al.</i> , 2005)
Zanetti <i>et al.</i> , 2006	SIVmneE11S	Modèle en champignon	gp120 du SIV non liée au CD4 (Chen <i>et al.</i> , 2005)
White <i>et al.</i> , 2010	SIVmac239 SIVmneE11S	Modèle en champignon	gp120 du VIH-1 liée au CD4s et à l'anticorps 17b (Kwong <i>et al.</i> , 1998)

Tableau 1. Récapitulatif des différents modèles de trimères d'enveloppe du SIV. Les souches simiennes sont précisées ainsi que les structures cristallographiques s'adaptant aux cartes de densité générées.

Ces études de modélisation ont abouti à des modèles très différents (**Figures 23A à 23D**). Le modèle de Zhu *et al.* présente une structure trimérique sous forme de tripode. Chaque monomère de gp120 est composé de trois lobes (latéral, proximal et principal) avec au sommet un pic joignant les trois hétérodimères. La partie inférieure du trimère est formée de trois courtes jambes ancrées dans la membrane virale par un prolongement latéral de la forme d'un pied (Zhu *et al.*, 2006) (**Figure 23A**). En revanche, les modèles de Zanetti *et al.* et White *et al.* proposent des modèles en forme de champignon. Les gp41 de chaque hétérodimère forment une structure compacte sans séparation visible, surmontées des sous-unités gp120 de forme globulaire (Zanetti *et al.*, 2006) (**Figure 23C**) ou allongée et incurvée (White *et al.*, 2010) (**Figures 23B et 23D**) qui entrent en contact au niveau du sommet du spicule pour former une cavité. Les différences observées entre les modèles s'expliquent principalement par le mode de recueil des données, l'analyse des images générées ainsi que les procédures de calcul utilisées (Roux & Taylor, 2007; Subramaniam, 2006; White *et al.*, 2010).

Les structures cristallographiques de la gp120 du SIV et du VIH-1 ont permis de représenter la disposition des différents domaines de la gp120 au sein des différents modèles de trimère décrits ci-dessus (**Tableau 1**). Malgré l'absence des boucles variables V1/V2 et V3 dans les structures cristallographiques, la position supposée de ces boucles au sein des spicules d'enveloppe a été décrite (**Figures 23E à 23H**). Toutefois, les boucles ne sont pas exposées de façon similaire selon les modèles. Les boucles V1/V2 seraient orientées vers la base du spicule dans les modèles de Zhu *et al.* (**Figure 23E**) et Zanetti *et al.* (**Figure 23G**), alors que dans le modèle de White *et al.* ces boucles seraient situées au sommet du spicule d'enveloppe (**Figures 23F et 23H**) (White *et al.*, 2010; Zanetti *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006). La boucle

V3 est orientée vers l'extérieur du trimère au niveau du lobe latéral dans le modèle de Zhu *et al.*, et est orientée de deux façons différentes, vers l'intérieur ou l'extérieur du trimère, dans le modèles de Zanetti *et al.* (Zanetti *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006).

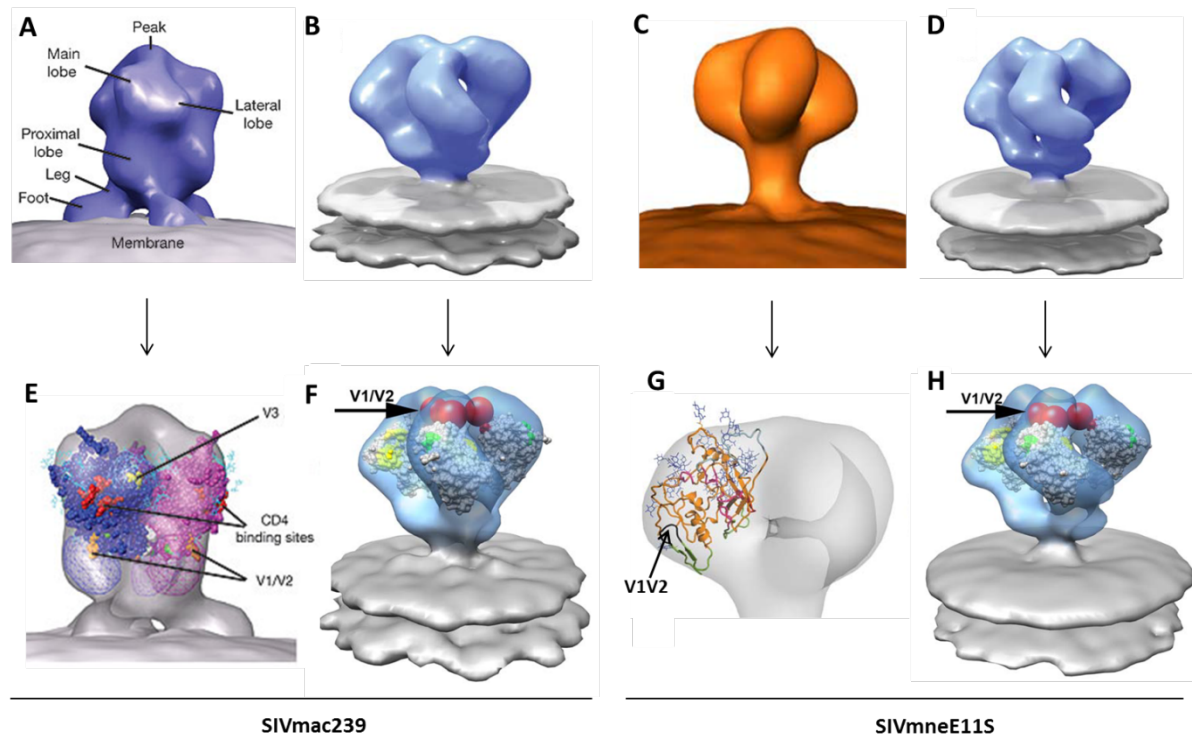


Figure 23. Modélisation de trimère d'enveloppe du SIV exposés à la surface des virions. A à D. Analyse tomographique des spicules du SIVmac239 (A et B) et du SIVmneE11S (C et D). **E à H.** Répartition des structures cristallographiques de la gp120 du SIV ou du VIH-1 au sein des cartes de densité des spicules du SIVmac239 (E et F) et SIVmneE11S (G et H). Les boucles variables V1/V2 et V3 sont indiquées (A et E : Zhu *et al.*, 2006 ; C et G : Zanetti *et al.*, 2006 ; B-D et F-H : White *et al.*, 2010).

■ Modélisation du trimère d'enveloppe du VIH-1

La structure des trimères d'enveloppe du VIH-1 exposés à la surface des virions a été déterminée à partir d'une souche HIV-1 Bal (Liu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008), de pseudovirus (Wu *et al.*, 2010a) et de gp140 solubilisées (Harris *et al.*, 2011). Les modélisations tomographiques des spicules d'enveloppe du VIH-1 générées sont résumées dans le **tableau 2**. La **figure 24** représente les modèles 3D des spicules d'enveloppe du VIH-1 ainsi que les corrélations entre la structure cristallographique de la gp120 et les modélisations tomographiques.

Auteur	Souche de SIV	Modèle 3D	Structure cristallographique
Liu <i>et al.</i> , 2008	HIV-1Bal	Modèle en champignon	- gp120 du VIH-1 liée à b12 (Zhou <i>et al.</i> , 2007) - gp120 du VIH-1 liée au CD4 et à X5 (Huang <i>et al.</i> , 2005) (Figure 23D)
Zhu <i>et al.</i> , 2008	HIV-1 Bal	Modèle en tripode	Non déterminé
Harris <i>et al.</i> , 2011	gp140 KNH144 et JR-FL	Modèle en champignon	gp120 du VIH-1 liée CD4s et à 17b (Kwong <i>et al.</i> , 1998)
Wu <i>et al.</i> , 2010a	pseudovirus	Modèle en cage	- gp120 du VIH-1 liée à b12 (Zhou <i>et al.</i> , 2007) - gp120 du VIH-1 liée au CD4 et à 48d (Pancera <i>et al.</i> , 2010a) (Figure 23E)

Tableau 2. Récapitulatif des différents modèles de trimères d'enveloppe du VIH-1. Les souches de VIH-1 sont précisées ainsi que les structures cristallographiques s'adaptant aux cartes de densité générées.

Le modèle de Liu *et al.* révèle une structure à l'apparence d'un champignon avec à sa base une structure compacte formée par les gp41 du complexe trimérique, recouverte par les sous-unités gp120 de forme allongées et incurvées, qui entrent en contact au niveau du sommet du spicule d'enveloppe pour former une cavité centrale (Liu *et al.*, 2008) (**Figure 24A**). Une structure similaire, réalisée à partir de gp140 solubilisées, a été obtenue récemment (Harris *et al.*, 2011) (**Figure 24F**). Ces structures du trimère d'enveloppe du VIH-1 en forme de champignon sont proches de celles obtenues par modélisation tomographiques des spicules d'enveloppe du SIV de l'étude de White *et al.* (White *et al.*, 2010) (**Figures 23B et 23D**). En revanche, les modèles de Zhu *et al.* et Wu *et al.* proposent une structure en tripode avec les sous-unités gp41 formant trois jambes séparées ancrées dans la membrane virale, surmontées des gp120 de forme globulaire (Zhu *et al.*, 2008) (**Figure 24B**), ou de forme allongée et courbée se joignant au sommet du spicule d'enveloppe pour former une structure creuse en forme de cage (Wu *et al.*, 2010a) (**Figure 24C**).

Malgré des modèles différents, les différentes structures cristallographiques de la gp120 du VIH-1 s'adaptent bien à ces modèles (**Tableau 2 ; Figures 24D à 24F**). Dans tous les modèles du trimère d'enveloppe du VIH-1 généré, les boucles variables V1/V2 et V3 de

chaque monomère seraient situées à proximité du sommet du spicule d'enveloppe (Harris *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010a).

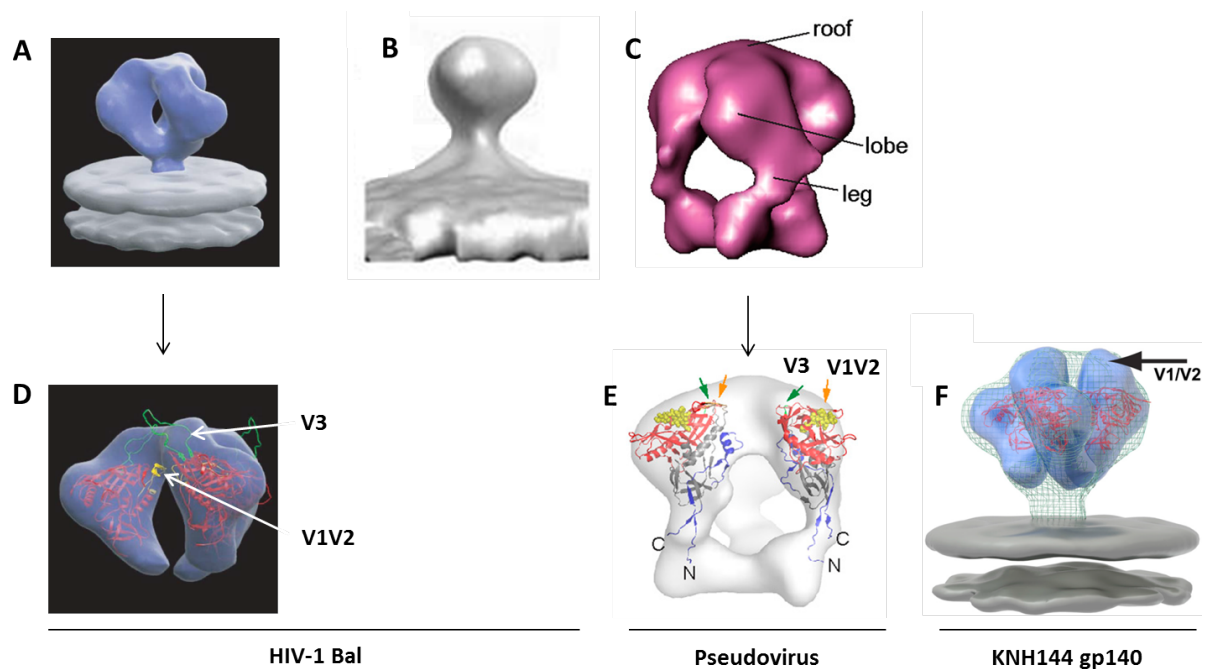


Figure 24. Modélisation de trimère d'enveloppe du VIH-1 exposés à la surface de virions ou solubilisés. A à C. Analyse tomographique des spicules du VIH-1. **D à F.** Répartition des structures cristallographiques de la gp120 du VIH-1. Les boucles variables V1/V2 et V3 sont indiquées (A et D : Liu *et al.*, 2008 ; B : Zhu *et al.*, 2008 ; C-E : Wu *et al.*, 2010a ; F : Harris *et al.*, 2010).

En conclusion, les différentes études réalisées ont permis de confirmer l'aspect trimérique des spicules d'enveloppe du SIV et du VIH-1, en proposant néanmoins des modèles divergents.

II.4- Mécanismes de l'entrée virale

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible est une étape clé du processus d'infection. La gp120 est impliquée dans les premières étapes de l'entrée virale en se fixant au récepteur CD4 et au corécepteur, alors que la gp41 est impliqué dans le processus de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule cible.

II.4.1- Fixation au récepteur CD4

▪ Le récepteur CD4

Le CD4 est le récepteur cellulaire principal du VIH (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984). C'est une molécule transmembranaire faisant partie de la superfamille des

immunoglobulines, formée d'une partie extracellulaire constituée de quatre domaines (D1 à D4), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique (Ryu *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1997). La gp120 se fixe au CD4 au niveau du domaine le plus externe, le domaine D1. Le CD4 est exprimé à la surface des cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T, les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Il joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du système immunitaire, notamment dans la formation du complexe CMH-peptide-TCR entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte T CD4⁺.

▪ Interaction gp120-CD4

Le site de liaison au CD4 de la gp120 est situé à l'interface entre les domaines interne et externe et le feuillet de liaison. La surface d'interaction entre la gp120 et le CD4 implique 802Å² de la gp120 et 742Å² du CD4. Vingt-six résidus de la gp120 et 22 résidus du CD4 sont directement impliqués dans cette interaction (Kwong *et al.*, 1998). Sur la gp120, la surface de contact comporte deux larges cavités. La plus large (279Å) est superficielle et remplie de molécules d'eau. Elle est formée de résidus variables n'intervenant pas directement dans l'interaction avec le CD4. La seconde cavité (152Å), située à la jonction des deux domaines et du feuillet de liaison, est profonde et constituée de résidus hydrophobes qui forment une poche dans laquelle pénètre le résidu phénylalanine 43 (Phe 43) du CD4 essentiel pour la liaison (Kwong *et al.*, 1998). Cette cavité, nommée Phe 43, joue donc un rôle central dans la liaison de la gp120 à son récepteur CD4.

Lors de la liaison au récepteur CD4, le trimère passe d'une conformation « fermée » à une conformation « ouverte ». Chaque monomère de gp120 subit une rotation d'environ 45° par rapport à l'axe central du trimère, une rotation de 15° sur lui-même et un déplacement du centre de gravité d'environ 15Å (Liu *et al.*, 2008). Ces changements conformationnels entraînent une exposition des gp41 ainsi qu'une réorientation des boucles variables V1/V2 et V3. La boucle V3 est orientée en direction de la membrane plasmique de la cellule cible alors que les boucles V1/V2 ainsi que le site de liaison au CD4 sont repositionnés en périphérie du spicule (Harris *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008) (**Figure 25**).

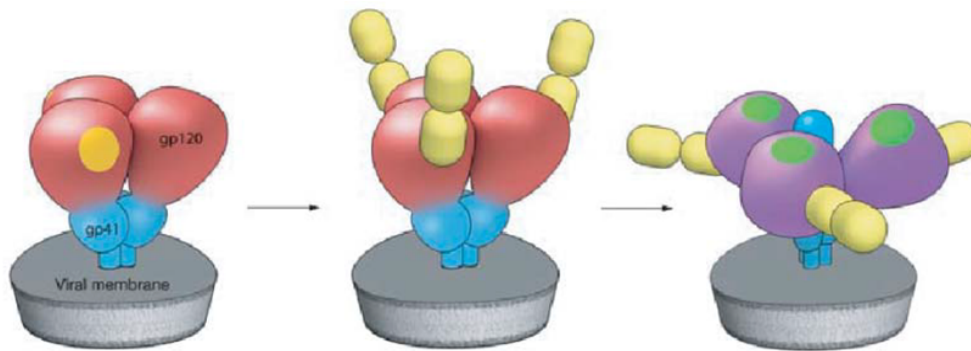


Figure 25. Représentation schématique des modifications conformationnelles du trimère d'enveloppe du VIH-1 induits par la liaison au CD4. Les gp120 et gp41 du trimère d'enveloppe sont représentées en rouge/violet et bleu respectivement. Le point jaune représente le site de liaison au CD4. Les domaines D1D2 du CD4 sont également représentés en jaune. Le point vert représente la localisation de la boucle variable V3 après liaison au CD4 (Liu *et al.*, 2008).

II.4.2- Fixation aux corécepteurs

▪ Les co-récepteurs CCR5 et CXCR4

La seule fixation de la gp120 au récepteur CD4 n'est pas suffisante pour permettre l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible. Elle nécessite une seconde interaction avec un ou des corécepteurs. Deux corécepteurs majeurs ont été mis en évidence : le récepteur CCR5 (Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996) et CXCR4 (Feng *et al.*, 1996). Le CCR5 et le CXCR4 sont des récepteurs aux chimiokines appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, caractérisés par sept domaines transmembranaires, une extrémité extracellulaire N-terminale et trois boucles extracellulaires formées par les passages transmembranaires successifs (ECL1, ECL2, ECL3) (Esté & Telenti, 2007; Huang *et al.*, 2007).

▪ Interaction gp120-corécepteur

Le site de liaison de la gp120 aux corécepteurs est localisé principalement au niveau de la boucle V3, et au niveau du feuillet de liaison de la gp120 avec les feuillets $\beta 2$ - $\beta 3$ à la base des boucles V1/V2 et les feuillets $\beta 20$ - $\beta 21$ dans le domaine constant C4 (Pantophlet & Burton, 2006; Rizzuto *et al.*, 1998). Ce site n'est exposé qu'après le changement de conformation de la gp120 induit par la liaison au récepteur CD4. La fixation de la gp120 au récepteur CD4 entraîne le rassemblement et la stabilisation des deux paires de feuillets β ($\beta 2$ -

$\beta 3$ et $\beta 20\text{-}\beta 21$) formant ainsi le site de liaison au co-récepteur (Pantophlet & Burton, 2006) (**Figure 26**).

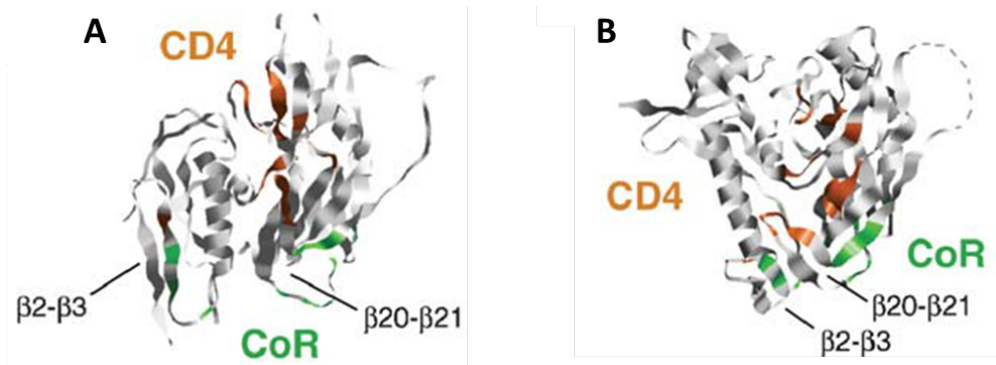


Figure 26. Position des sites de liaison au récepteur et co-récepteur au sein de la structure de la gp120 liée ou non au CD4. A. Structure de la gp120 du SIV non liée au CD4. B. Structure de la gp120 du VIH-1 liée au CD4. Les résidus entrant en contact avec le CD4 et le co-récepteur sont représentés en orange et vert respectivement (Pantophlet & Burton, 2006).

Les éléments des corécepteurs CCR5 et CXCR4 impliqués dans l'interaction avec la gp120 sont localisés au niveau de l'extrémité N-terminale et de la seconde boucle extracellulaire (ECL-2) (Tagliamonte *et al.*, 2011). L'extrémité N-terminale interagit avec la base de la boucle V3 et le feuillet de liaison de la gp120, alors que la boucle ECL-2 entre en contact avec le sommet de la boucle V3 (Huang *et al.*, 2007) (**Figure 27**). L'interaction gp120-corécepteur induit de nouvelles modifications conformationnelles conduisant à l'exposition du domaine extracellulaire de la gp41.

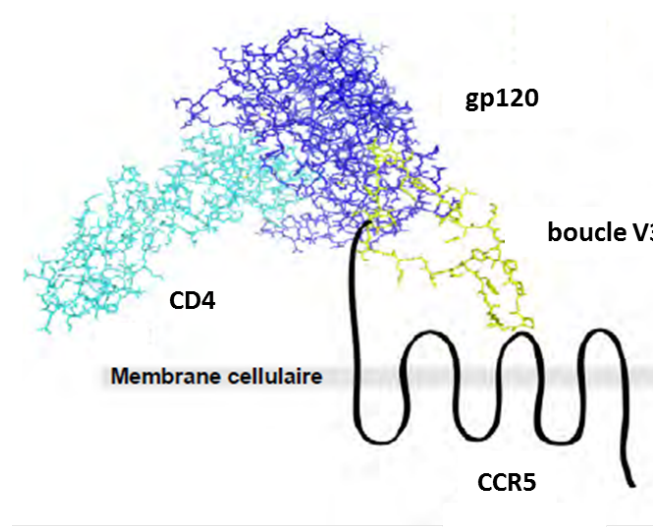


Figure 27. Modèle de l'interaction entre la gp120 et le corécepteur CCR5. Ce modèle est basé sur la structure cristallographique de la gp120 contenant la boucle V3, liée au CD4 (Huang *et al.*, 2005). Le cœur de la gp120 (bleu foncé), la boucle V3 (jaune), le CD4 (bleu clair) et le corécepteur CCR5 (noir) sont représentés (Lobritz *et al.*, 2010).

II.4.3- Le mécanisme de fusion

La fixation de la gp120 au corécepteur entraîne l'exposition du peptide de fusion de la gp41 et son insertion dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible, formant ainsi une structure en pré-épingle à cheveux. Le repliement des hélices HR-2 sur le trimère d'hélice HR-1 conduit à la formation d'une structure superhélicoïdale de 6 hélices α en épingle à cheveux. Cette conformation induit le rapprochement des membranes virale et cellulaire aboutissant à leur fusion et à la création d'un pore permettant l'entrée de la capside virale dans le cytoplasme de la cellule cible (Doms & Moore, 2000) (**Figure 28**).

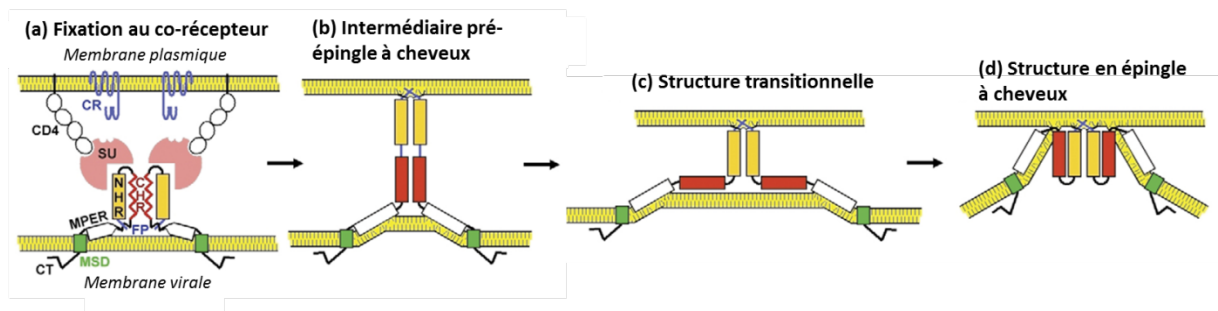


Figure 28. Représentation schématique des différentes étapes du processus de fusion. Après fixation au co-récepteur, des modifications conformationnelles entraînent l'exposition et l'insertion du peptide de fusion dans la membrane plasmique de la cellule cible formant ainsi une structure en pré-épingle à cheveux puis une structure complexe en épingle à cheveux. Cette structure induit le rapprochement des membranes virale et cellulaire aboutissant à leur fusion (d'après Roux & Taylor, 2007).

II.4.4- Autres récepteurs impliqués dans l'entrée virale

Le VIH-1 a la capacité de se fixer à d'autres récepteurs cellulaires qui permettent d'attacher et de concentrer le virus à la surface des cellules cibles. L'adsorption des particules virales à la surface cellulaire peut se faire via des récepteurs à mannose sur les macrophages, le récepteur DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques ainsi que des protéoglycanes à héparines sulfates qui peuvent interagir avec les sucres de la gp120 (Clapham & McKnight, 2002). Il a été montré que le traitement de cellules par des héparinases empêche la fixation du VIH-1 à la surface cellulaire et inhibe l'infection virale (Roderiquez *et al.*, 1995). L'intégrine $\alpha 4\beta 7$, présente à la surface des lymphocytes T $CD4^+$ se lie également à la gp120 via la boucle V2 (Arthos *et al.*, 2008). L'attachement du HIV-1 peut également s'effectuer par des interactions virus-cellule indépendantes de la gp120. En effet, les particules virales peuvent intégrer dans leur enveloppe des molécules de la membrane phospholipidique de la cellule hôte au cours de

la phase de bourgeonnement. Différentes molécules d'adhésion issues de la cellule hôte et intégrées dans la membrane virale pourraient ainsi jouer un rôle dans l'adhésion des particules virales sur la cellule cible, notamment ICAM-1 et son ligand LFA-1 (Tardif & Tremblay, 2005).

II.5- Le tropisme viral

Le tropisme viral correspond à la capacité du VIH-1 à infecter différentes populations de cellules selon que ces cellules expriment le ou les corécepteurs CCR5 et CXCR4. On distingue deux types de virus selon leur capacité à utiliser l'un ou l'autre des corécepteurs : les variants viraux utilisant spécifiquement le récepteur CCR5 sont nommés virus R5, ceux qui utilisent spécifiquement le récepteur CXCR4 sont nommés virus X4, et ceux qui sont capables d'utiliser les deux corécepteurs sont nommés virus R5X4 ou « dual tropiques » (Esté & Telenti, 2007). Contrairement aux virus R5, qui sont non inducteurs de syncytia (Non Syncytium Inducing ou NSI), les virus X4 sont capables d'induire la formation de syncytia dans la lignée lymphocytaire T CD4⁺ MT2, et sont donc nommés virus inducteurs de syncytia (Syncytium Inducing ou SI) (Mammano & Labrosse, 2007).

Indépendamment du mode de transmission, les virus R5 sont préférentiellement transmis et sont présents durant la phase précoce et la phase asymptomatique de l'infection alors que des conversions phénotypiques R5-X4 vont apparaître progressivement au cours de l'évolution de la maladie. L'apparition de l'immunodéficience s'accompagne, chez environ la moitié des individus infectés, de l'émergence de variants X4 (Esté & Telenti, 2007).

Les cellules cibles de l'infection *in vivo* sont les lymphocytes et les macrophages. Les macrophages expriment à la fois le CCR5 et le CXCR4 ; les virus à tropisme macrophagique ne se limitent donc pas aux virus R5. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ primaires expriment également les deux corécepteurs et peuvent donc être infectés par des virus R5 et X4, au contraire des cellules de lignées lymphocytaires T qui n'expriment que le CXCR4 et ne sont donc susceptibles qu'à l'infection par des virus X4. Les virus R5 sont donc capables d'infecter des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺ primaires alors que certains virus R5 sont exclusivement lymphotropes. Certains virus X4 infectent à la fois les lymphocytes et les macrophages, même si le niveau de réplication virale dans ces derniers est généralement faible. Néanmoins, la plupart des virus X4 n'infectent que les lymphocytes primaires ou

immortalisés. Les virus R5X4 sont capables d'entrer dans les macrophages, les lymphocytes T CD4⁺ primaires ainsi que des lignées lymphocytaires T CD4⁺ (Mammano & Labrosse. 2007) (**Figure 29**).

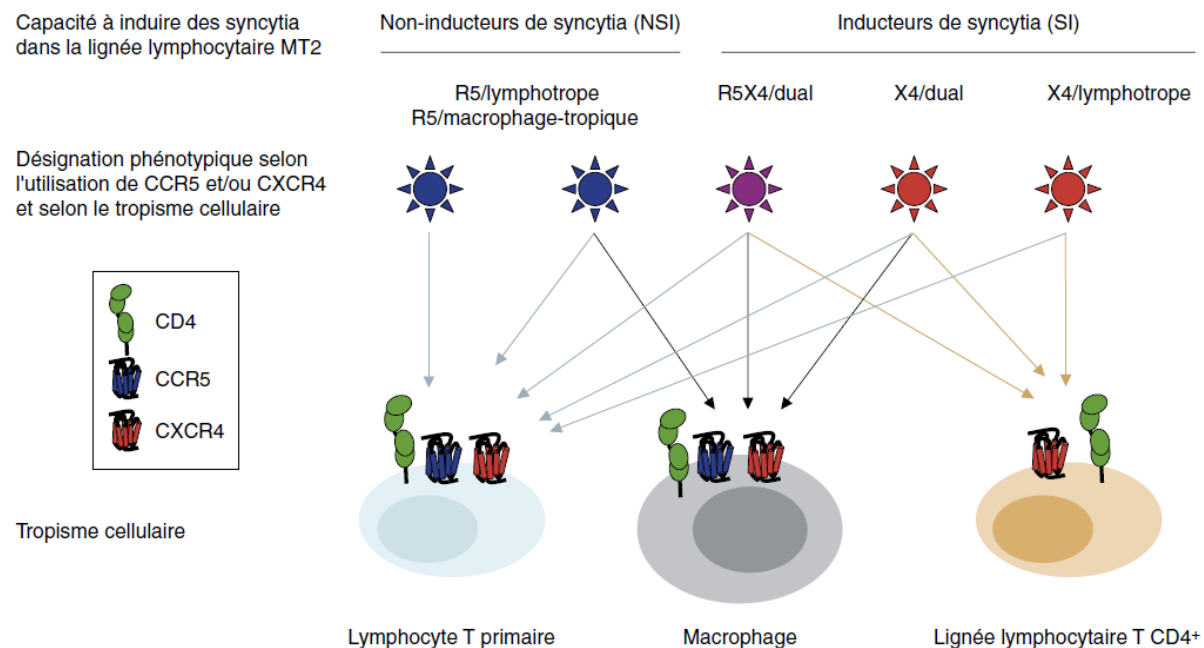


Figure 29. Tropisme du VIH-1. Les variants du VIH-1 utilisant préférentiellement le corécepteur CCR5 sont nommés virus R5, ceux utilisant préférentiellement le corécepteur CXCR4 sont nommés X4, et ceux utilisant les deux corécepteurs sont nommés virus R5X4. Suivant l'utilisation du corécepteur, ces différents variants présentent une capacité différente à induire des syncytia dans la lignée lymphocytaire MT2 et infectent différents types cellulaires (Mammano & Labrosse. 2007).

La boucle variable V3 joue un rôle essentiel dans le tropisme viral (Cardozo *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 1991; Shioda *et al.*, 1992). Des changements minimes dans la séquence protéique de la boucle V3 permettent de passer d'un tropisme R5 vers un tropisme X4. En effet, la présence d'acides aminés chargés positivement (arginine ou lysine) en position 11 et/ou 25 a été associée à l'utilisation préférentielle du corécepteur CXCR4 pour l'entrée du virus ; inversement, la présence d'acides aminés neutres ou chargés négativement (acide aspartique ou glutamique) à ces positions a été associée à l'utilisation de CCR5 (Fouchier *et al.*, 1992; De Jong *et al.*, 1992). Une augmentation de la charge électrostatique nette de la boucle V3 est également associée à l'utilisation du corécepteur CXCR4 (Fouchier *et al.*, 1992).

III- La neutralisation du VIH-1

Il est actuellement admis que le meilleur moyen d'empêcher ou de contrôler l'épidémie de SIDA passe par le développement d'un vaccin qui protégerait de l'infection par le VIH-1. L'activité protectrice des anticorps neutralisants a été démontrée chez l'Homme *in vivo* pour de nombreuses infections virales telles que les hépatites A et B, la poliomyélite, la rage, la rougeole et la grippe (Burton, 2002; Casadevall *et al.*, 2004; Casadevall, 1999; Keller & Stiehm, 2000). Pour le VIH-1, il a été montré que l'administration passive d'anticorps neutralisants conférait une protection (« immunité stérilisante ») vis-à-vis de l'infection virale dans des modèles animaux (Baba *et al.*, 2000; Ferrantelli *et al.*, 2003; Gauduin *et al.*, 1997; Hessel *et al.*, 2009a, b, 2010; Mascola *et al.*, 1999, 2000). L'induction d'anticorps neutralisants de large spectre susceptibles de bloquer l'infection par des souches très diverses est donc un objectif majeur dans le développement d'un vaccin préventif contre le VIH-1 (Barouch, 2008; Burton *et al.*, 2004; Hoxie, 2010; Koff, 2011; Mascola & Montefiori, 2010; Mascola, 2003; Walker & Burton, 2010). Cependant, à ce jour, aucun immunogène n'est capable de générer une telle réponse neutralisante (Kwong *et al.*, 2011; Schief *et al.*, 2009; Walker & Burton, 2010).

III.1- La neutralisation virale par les anticorps

La neutralisation virale par les anticorps est une composante importante de l'immunité antivirale. La neutralisation est définie comme la perte de l'infectivité virale résultant de la fixation d'anticorps sur le virion. Les anticorps neutralisants sont donc classiquement définis par un rôle fonctionnel d'inhibition de l'infection des cellules cibles *in vitro* (Klasse & Sattentau, 2002). Il est considéré que les anticorps protecteurs *in vivo* sont neutralisants *in vitro* (Barin, 2002). Les anticorps neutralisants interfèrent avec une ou plusieurs étapes du cycle viral (Klasse & Sattentau, 2002; Zolla-Pazner, 2004) (**Figure 30**). La fixation des anticorps aux particules virales libres ou aux cellules infectées peut induire : (i) une agrégation des particules virales libres réduisant ainsi la taille de l'inoculum et l'infectivité de la population virale ; (ii) une inhibition de l'interaction entre l'enveloppe virale et les récepteurs cellulaires par encombrement stérique (Hangartner *et al.*, 2006) ; (iii) une inhibition post-attachement empêchant ainsi la fusion des membranes virale et cellulaire ; (iv)

une altération des mécanismes post-fusion tels que la libération du virus dans le cytoplasme cellulaire, ou des mécanismes plus tardifs du cycle viral comme l'assemblage et le bourgeonnement viral.

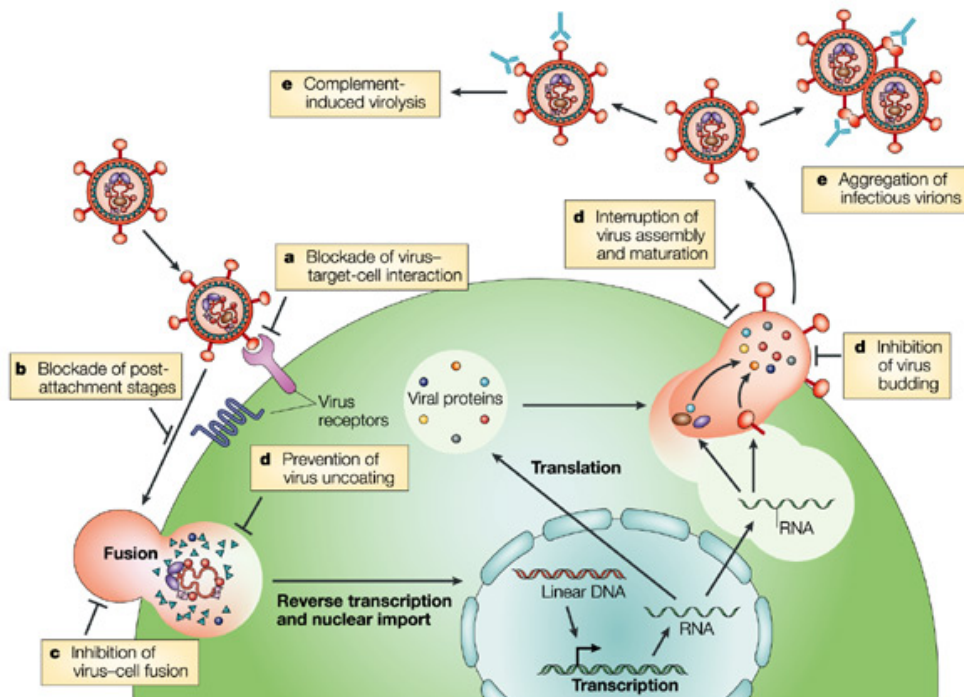


Figure 30. Mécanismes d'action antivirale des anticorps (exemple du VIH-1). Les mécanismes d'action des anticorps sont multiples : (a) inhibition de l'interaction entre l'enveloppe virale et les récepteurs cellulaires, (b) inhibition des étapes post-attachement, (c) inhibition de la fusion des membranes virale et cellulaire, (d) inhibition des étapes tardives du cycle viral telles que la libération du virus dans le cytoplasme cellulaire, l'assemblage et le bourgeonnement viral, (e) agrégation et lyse des virions libres par le complément (Zolla-Pazner, 2004).

Des anticorps non neutralisants, caractérisés par l'absence d'activité neutralisante, contribueraient à l'activité antivirale via le récepteur au fragment constant Fc des anticorps (Forthal & Moog, 2009; Huber & Trkola, 2007). En effet, la fixation des anticorps aux particules virales libres ou aux cellules infectées peut entraîner : (i) la lyse des virions par activation de la cascade du complément ainsi que la lyse des cellules infectées par cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDCC : complement-dependent cellular cytotoxicity) ; (ii) une opsonisation des particules virales par les anticorps ou des éléments du complément, entraînant leur phagocytose via des récepteurs Fc ou des récepteurs du complément ; (iii) une lyse des cellules infectées par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC : antibody-dependent cellular cytotoxicity) ou par inhibition de la réplication virale via le mécanisme d'inhibition du virus à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCVI :

antibody-dependent cell-mediated virus inhibition) (Baum, 2010; Forthal & Moog, 2009) (Figure 31).

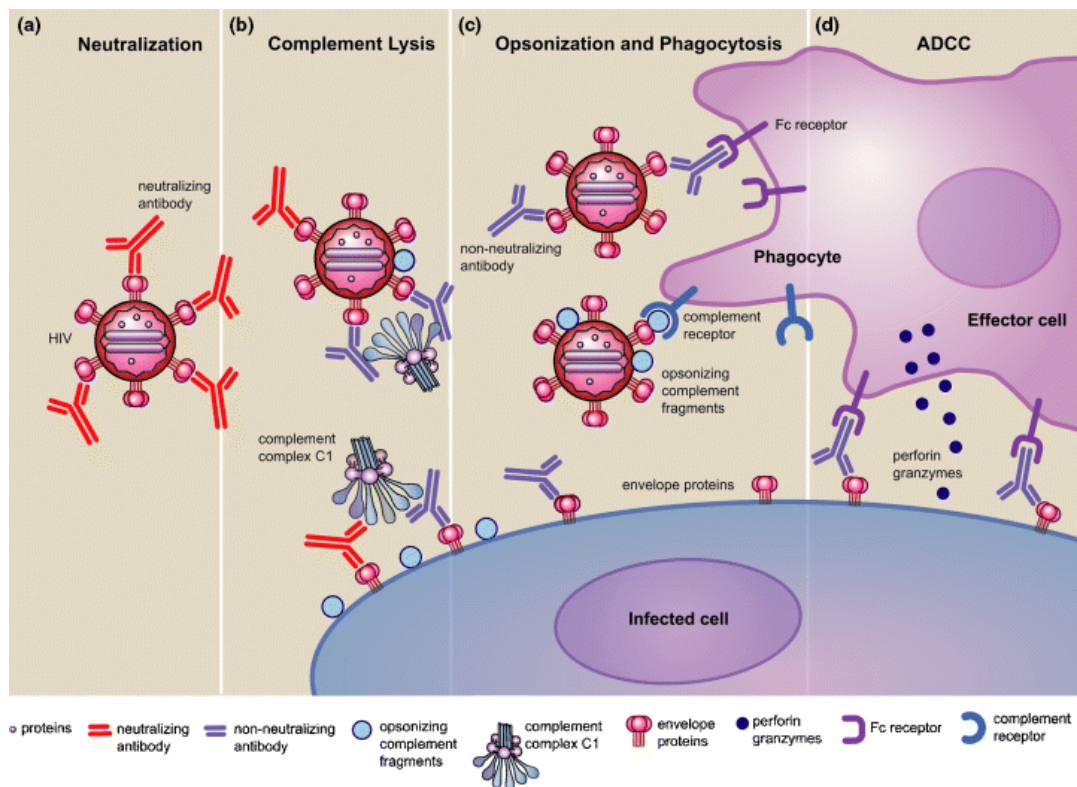


Figure 31. Mécanismes d'action des anticorps neutralisants et non neutralisants. (a) neutralisation des virions libres par les anticorps neutralisants, (b) lyse des virions libres et des cellules infectées par activation de la cascade du complément (CDCC), (c) opsonisation des particules virales par les anticorps ou des éléments du complément et phagocytose via des récepteurs Fc ou des récepteurs du complément, (d) lyse des cellules infectées par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Huber & Trkola, 2007).

Récemment, le rôle protecteur de trois anticorps monoclonaux, un anticorps monoclonal largement neutralisant dirigé contre le site de liaison au CD4 de la gp120 (b12) et deux anticorps monoclonaux non neutralisants, l'un dirigé contre le site de liaison au CD4 (b6) et l'autre dirigé contre un épitope immunodominant de la gp41 (F240), a été évalué chez le macaque lors d'une épreuve virulente réalisée par voie vaginale avec un virus chimère Simian-Human Immunodeficiency Virus (SHIV) (Burton *et al.*, 2011). L'administration de l'anticorps largement neutralisant b12 confère une immunité stérilisante chez les 7 macaques infectés, alors que l'administration des anticorps monoclonaux non neutralisants confère peu (F240 ; 2 sur 5 animaux) ou pas (b6 ; 0 sur 5 animaux) de protection vis-à-vis de l'infection. Ces résultats démontrent la capacité protectrice limitée des anticorps non neutralisants et la

nécessité de tenter de développer un vaccin basé en priorité sur l'induction d'anticorps neutralisants puissants (Burton *et al.*, 2011).

III.2- La réponse neutralisante anti-VIH-1 au cours de l'infection naturelle

III.2.1- Cinétique d'apparition des anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe

Lors d'une infection par le VIH-1, une réponse humorale est rapidement mise en place, caractérisée par la production de différents anticorps (Alter & Moody, 2010; Haynes *et al.*, 2011) (**Figure 32**). Une réponse spécifique non neutralisante est rapidement détectée contre la gp41 (13 jours en moyenne après le début de la virémie), puis plus tardivement contre la gp120 (27 jours en moyenne après le début de la virémie) (McMichael *et al.*, 2010; Tomaras *et al.*, 2008). Cette réponse est principalement dirigée contre la « face non neutralisante » de la gp120, masquée à l'intérieur de la forme native trimérique gp120-gp41 de la glycoprotéine d'enveloppe. Cette face de l'enveloppe est fréquemment et rapidement exposée au système immunitaire du fait de la faible stabilité et de la dissociation des trimères à la surface des virions aboutissant à un relargage important de monomères de gp120 (Moore *et al.*, 2006; Wyatt & Sodroski, 1998). Bien que ces anticorps soient détectés très précocement, ils ne possèdent aucun pouvoir de neutralisation. Dans un second temps, une réponse autologue neutralisante, dirigée contre les variants autologues de la quasi-espèce virale infectant l'individu, est mise en place dans les premières semaines suivant la primo-infection chez la majorité des individus infectés par le VIH-1. Cette réponse neutralisante, inefficace contre les virus hétérologues, exerce une pression de sélection aboutissant à une évolution continue de mutants viraux échappant à la neutralisation (Richman *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003). Enfin, certains individus développent, plusieurs années après la primo-infection, des anticorps neutralisants de large spectre. Ces anticorps sont capables de neutraliser *in vitro* un grand nombre d'isolats primaires hétérologues appartenant à différents sous-types (Stamatatos *et al.*, 2009). C'est cette dernière réponse neutralisante qu'il serait souhaitable d'induire par immunisation dans le cadre du développement d'un vaccin préventif contre le VIH-1.

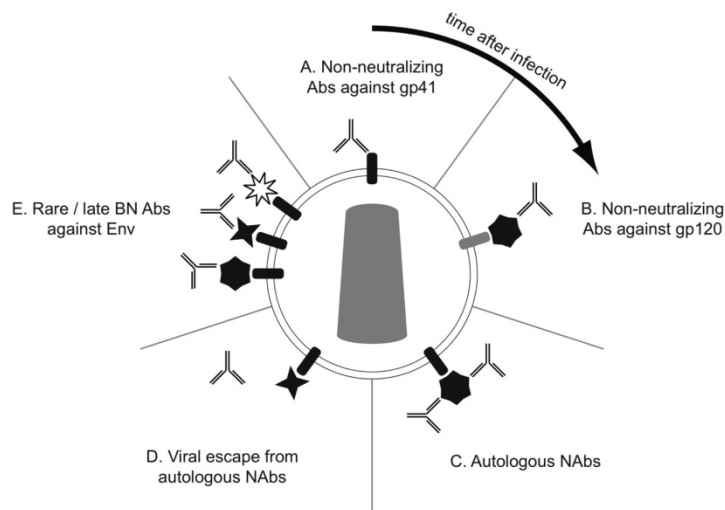


Figure 32. Cinétique d'apparition des anticorps au cours de l'infection naturelle. Lors de l'infection par le VIH-1, des anticorps non neutralisants dirigés contre la gp41 et la gp120 sont détectés chez les individus infectés (A - B). Dans les semaines suivant la primo-infection, des anticorps neutralisants dirigés contre les virus autologues sont produits (C) mais exercent une pression de sélection aboutissant à l'échappement rapide du virus (D). Certains individus développent des anticorps largement neutralisants après plusieurs années d'infections (E) (Alter & Moody, 2010).

III.2.2. Réponse neutralisante autologue

- Une réponse précoce mais inefficace

La réponse neutralisante autologue correspond au développement d'anticorps neutralisants dirigés contre les variants de la quasi-espèce virale d'un individu infecté. Décrite par Weiss *et al.* dès 1986 (Weiss *et al.*, 1986), la réponse neutralisante autologue a fait l'objet de nombreuses études visant à déterminer sa cinétique d'apparition, ses épitopes cibles sur la glycoprotéine d'enveloppe et les mécanismes développés par le virus pour y échapper. Ainsi, dès les premières semaines suivant la primo-infection, une intense réponse autologue apparaît aussi bien chez des individus infectés par des virus de sous-type B (Aasa-Chapman *et al.*, 2004; Bunnik *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006a; Richman *et al.*, 2003) que chez des individus infectés par des virus de sous-type C (Gray *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2006a). Toutefois, les titres en anticorps neutralisants autologues ne sont pas équivalents entre les deux sous-types, les individus infectés par des virus de sous-type C présenteraient des titres en anticorps neutralisants en moyenne 3,5 fois plus élevés que les titres observés chez les individus infectés par des virus de sous-type B (Li *et al.*, 2006a). Ces anticorps sont spécifiques de l'isolat et ne présentent pas ou très peu de neutralisation croisée vis-à-vis d'isolats

hétérologues (Gray *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2006a). De plus, lors d'une surinfection, les anticorps neutralisants autologues présentent une faible activité protectrice vis-à-vis de cette nouvelle infection, illustrant l'incapacité de ces anticorps à protéger lorsqu'une infection est déjà établie (Blish *et al.*, 2007; Braibant *et al.*, 2010; Piantadosi *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2006).

Malgré une apparition précoce, les anticorps neutralisants autologues apparaissent inefficaces dans le contrôle de la réplication virale. En effet, la réponse neutralisante est efficace vis-à-vis des variants plasmatiques de la quasi-espèce virale présents plusieurs semaines ou mois avant un prélèvement, mais en général, elle apparait inexistante ou faible vis-à-vis du variant émergent contemporain. En raison de la sélection permanente de variants résistants à la neutralisation, les anticorps neutralisants autologues sont incapables de neutraliser les variants majoritaires contemporains (Richman *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003) (**Figure 33**).

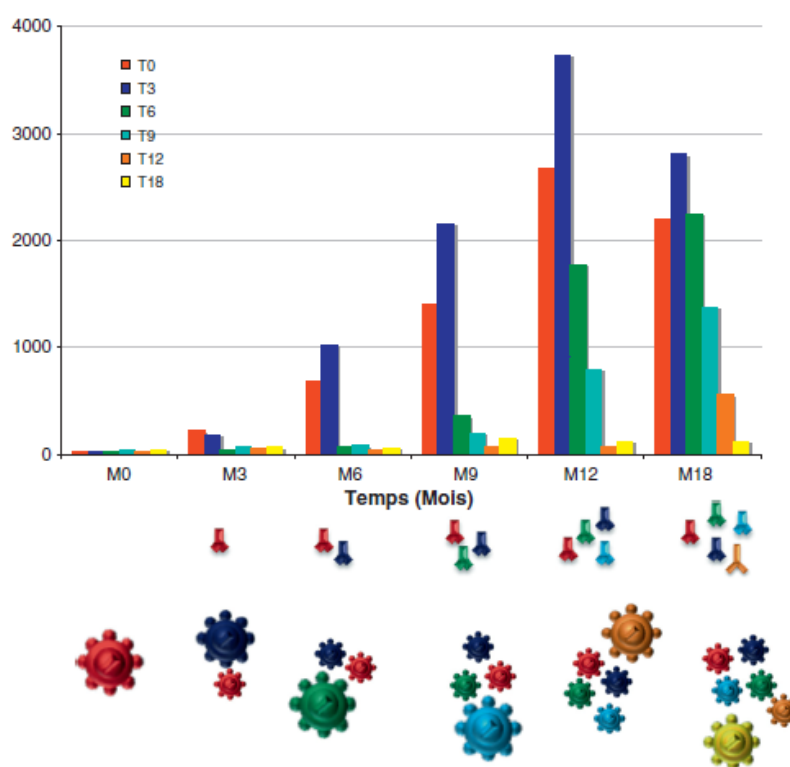


Figure 33. Evolution de la réponse neutralisante au cours des premiers mois suivant la primo-infection et échappement du virus aux anticorps neutralisants autologues. Illustration d'un cas décrit par Richman *et al.* (Richman *et al.*, 2003). Le code couleur correspond aux différents prélèvements séquentiels (T0, ..., T18). La partie haute du schéma illustre l'augmentation progressive du titre des anticorps neutralisants autologues vis-à-vis de la population virale présente aux différents temps. La partie basse est une représentation schématique de l'apparition progressive des anticorps neutralisants vis-à-vis des différents variants générés au cours du temps. Ceci montre que la réponse

neutralisante est efficace vis-à-vis des variants de la quasi-espèce antérieurement présents, mais en général inefficace vis-à-vis du variant émergent contemporain (Braibant *et al.*, 2011).

- Mécanismes d'échappement du VIH-1

Les anticorps neutralisants autologues sont de spécificité étroite. Ils exercent une pression de sélection qui conduit à une évolution continue de mutants échappant à la neutralisation (Frost *et al.*, 2005; Mahalanabis *et al.*, 2009; Richman *et al.*, 2003). Plusieurs travaux ont montré que les mutants d'échappement présentaient une augmentation de la taille des régions variables de la gp120, ainsi qu'une augmentation et/ou une redistribution des PNGS à la surface de l'enveloppe virale, notamment au niveau des boucles variables V1/V2 (Bunnik *et al.*, 2008; Dacheux *et al.*, 2004; Gray *et al.*, 2007a ; Moore *et al.*, 2009a; Pinter *et al.*, 2004; Rong *et al.*, 2007a, 2009; Sagar *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2007; van Gils *et al.*, 2011a; Wei *et al.*, 2003; Wolk & Schreiber, 2006). Ces glycanes formeraient, de par leur taille imposante, un bouclier glycanique dynamique qui limiterait l'accessibilité des anticorps aux épitopes neutralisants par encombrement stérique (Wei *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'échappement à la neutralisation et la diversification de l'enveloppe peuvent également résulter de substitutions ponctuelles d'acides aminés (Frost *et al.*, 2005; Mahalanabis *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2009a; Rong *et al.*, 2009). Une étude récente de Rong *et al.* a suggéré qu'une seule voie de mutation n'était pas suffisante pour conférer un échappement lors d'une infection par des virus de sous-type C. Au contraire, de multiples stratégies sont développées afin d'échapper à la neutralisation par les anticorps neutralisants autologues (Rong *et al.*, 2009).

Ces modifications au sein des glycoprotéines d'enveloppes conduisent à un camouflage ou à une altération des épitopes neutralisants, soit par effet direct sur les épitopes cibles, soit de manière indirecte, par action à distance sur l'exposition de l'épitope par des changements de la structure tertiaire voire quaternaire des glycoprotéines d'enveloppes (**Figure 34**).

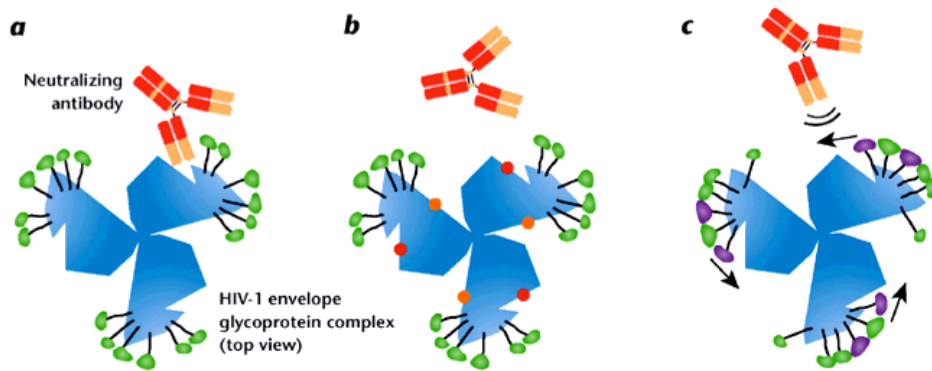


Figure 34. Mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse neutralisante. (a) Les anticorps neutralisants sont capables de neutraliser les virions en se fixant au niveau d'épitopes localisés sur les glycoprotéines d'enveloppe virale. Ces anticorps exercent une pression de sélection aboutissant à l'évolution continue de mutants échappant à la neutralisation. (b) L'échappement à la neutralisation peut résulter de mutations ponctuelles pouvant altérer les épitopes neutralisants ou (c) d'une augmentation et/ou redistribution des sites potentiels de glycosylation empêchant l'accès des anticorps neutralisants aux épitopes cibles par encombrement stérique (Mascola & Montefiori, 2003).

La sélection de mutants d'échappement pourrait aboutir à une augmentation de la résistance à la neutralisation au sein d'une population virale au cours de l'épidémie. Il a récemment été montré au sein d'une population de patients infectés exclusivement par des virus de sous-type B, que les virus isolés au cours de la primo-infection chez des sujets infectés au début de l'épidémie (fin des années 80) étaient plus sensibles à la neutralisation que ceux isolés de sujets infectés récemment (années 2000), et que l'augmentation de la résistance s'accompagnait d'une diminution de la réponse neutralisante autologue (Bunnik *et al.*, 2010a). Cette résistance à la neutralisation semblerait associée à une augmentation de la longueur et de la glycosylation de la boucle variable V1 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (Bunnik *et al.*, 2010a). De plus, il a été montré que le VIH-1 semblait devenir plus résistant au cours de l'épidémie à la neutralisation dirigée contre le site de liaison au CD4. Cette observation est liée à la constatation d'une diminution de sensibilité aux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants b12 et VRC01. Une augmentation de la résistance à l'anticorps monoclonal PG16 est également observée (Bunnik *et al.*, 2010a; Euler *et al.*, 2011) (Cf Partie III.2.4).

- Pression de sélection et conséquences fonctionnelles pour le virus

Malgré cette extraordinaire capacité d'échappement, différents travaux suggèrent que l'évolution de l'enveloppe virale sous pression de sélection n'est certainement pas sans conséquences fonctionnelles pour le virus. Derdeyn *et al.* ont montré que les variants retrouvés précocement chez un sujet « receveur » étaient plus sensibles à la neutralisation et leurs enveloppes plus compactes (nombre d'acides aminés plus faible) et moins glycosylées (nombre de PNGS plus faible) que la plupart des variants retrouvés chez le sujet « donneur » lui ayant transmis le virus (Derdeyn *et al.*, 2004). Cela signifierait qu'il existe un avantage réplcatif pour les virus dont l'enveloppe est plus faiblement glycosylée (meilleur fitness) et que la résistance à la neutralisation du virus se fait au détriment de cette capacité réplcative. Des observations similaires ont également été rapportées dans d'autres études (Blish *et al.*, 2007; Chohan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006b). Quelques rares travaux portant sur l'étude de la réponse neutralisante autologue en phase tardive d'infection ont permis de conforter cette hypothèse (Bunnik *et al.*, 2008; Deeks *et al.*, 2006). Les travaux de Bunnik *et al.* ont mis en évidence une augmentation progressive de la taille et de la glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe lors des premiers mois ou premières années après l'infection. Au contraire, au stade tardif de l'infection, lorsque la pression immune diminue, une réversion des changements de longueur et de glycosylation de la glycoprotéine d'enveloppe est observée, suggérant l'effet négatif de ces changements au sein de la glycoprotéine d'enveloppe sur le fitness viral (Bunnik *et al.*, 2008). Les travaux de Deeks *et al.* ont quant à eux montré une intensification de la réponse autologue contre les variants majoritaires contemporains au cours du temps chez les patients chroniquement infectés confortant l'hypothèse d'une limitation des capacités d'échappement du VIH (Deeks *et al.*, 2006). Cependant, la capacité réplcative de virus isolés au cours de l'infection de sujets progressseurs dont certains ont développé une forte réponse neutralisante a été analysée récemment et a montré que l'échappement à la neutralisation ne diminuait pas la capacité réplcative virale (Bunnik *et al.*, 2010b).

- Cibles des anticorps neutralisants autologues

Les anticorps neutralisants autologues ont pour cible les régions variables de l'enveloppe virale, expliquant ainsi spécificité étroite de ces anticorps (Moore *et al.*, 2009b). Il a en effet été montré que les anticorps neutralisants autologues ciblent de multiples épitopes localisés au sein des boucles variables V1V2 en particulier, mais aussi la région C3V4, l'hélice alpha 2

($\alpha 2$) localisée dans le domaine C3 et, dans une moindre mesure, les boucles V4 et V5 (Gray *et al.*, 2011a; Lynch *et al.*, 2011b; Moore *et al.*, 2008, 2009a; Pinter *et al.*, 2005; Rong *et al.*, 2007b, 2009). La région variable V3, région très immunogène de l'enveloppe virale, a été initialement décrite comme le principal déterminant de neutralisation (PND : principal neutralization domain) (Javaherian *et al.*, 1990, 1989; LaRosa *et al.*, 1991). La majorité des individus infectés développent des anticorps dirigés contre la boucle V3 mais leur rôle dans la neutralisation autologue reste contradictoire (Zolla-Pazner & Cardozo, 2010). Il a récemment été montré que, bien que des anticorps dirigés contre la boucle V3 soient produits tôt lors de l'infection et à de forts titres, ils ne contribuent pas à la neutralisation autologue (Davis *et al.*, 2009a, b; Moore *et al.*, 2008). Ceci viendrait du fait que la boucle V3 serait masquée à l'intérieur du trimère de nombreux isolats primaires (Davis *et al.*, 2009a, b; Hartley *et al.*, 2005). Une étude récente de Tang *et al.* a néanmoins mis en évidence un nouvel épitope cible des anticorps neutralisants autologues localisé sous la base de la boucle V3, à proximité du site de liaison au corécepteur de la gp120 (Tang *et al.*, 2011).

III.2.3- Réponse neutralisante hétérologue et de large spectre

- Une réponse rare et tardive

Contrairement à la réponse neutralisante autologue, certains individus développent une réponse neutralisante hétérologue voire de large spectre après plusieurs années d'infection. Les anticorps largement neutralisants contenus dans le sérum de ces individus sont capables de neutraliser *in vitro* des isolats primaires hétérologues appartenant à différents sous-types. Une étude récente de Mikell *et al.* a montré qu'une telle réponse neutralisante était détectée dans le sang d'individus infectés par des virus de sous-type B en moyenne 2,5 ans après l'infection. Dans de rares cas, des anticorps neutralisants de large spectre peuvent apparaître un an post-infection (Mikell *et al.*, 2011). Ces travaux ont été confirmés par Gray *et al.*, qui a montré que l'activité neutralisante de large spectre est présente 2 à 3 ans après infection au sein d'individus infectés par des virus de sous-type C, avec un pic de l'activité neutralisante observé 4 ans post-infection (Gray *et al.*, 2011b). Ce sont chez les sujets chroniquement infectés, virémiques, asymptomatiques et non traités que l'on retrouve plus fréquemment des anticorps neutralisants de large spectre (Braibant *et al.*, 2006; Doria-Rose *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007, 2009; Sather *et al.*, 2009). Toutefois, de tels anticorps ont récemment été détectés

chez quelques patients VIH⁺ sous traitement antirétroviral présentant une virémie indétectable (Medina-Ramírez *et al.*, 2011).

La présence d'anticorps neutralisants de large spectre ne semble pas influencer la progression de l'infection (Euler *et al.*, 2010; Piantadosi *et al.*, 2009; van Gils *et al.*, 2011b, 2010). Deux études ont mis en évidence que le développement d'anticorps neutralisants puissants, résultant d'une forte stimulation antigénique en début d'infection, n'influençait pas la progression de la maladie (Piantadosi *et al.*, 2009; van Gils *et al.*, 2009). Il a également été montré que l'activité neutralisante de large spectre était équivalente chez des sujets ALT et des sujets progresseurs (van Gils *et al.*, 2010, 2009). De plus, au sein de sujets ALT, la présence d'anticorps largement neutralisants est plus fréquemment détectée chez ceux ayant une évolution clinique ultérieure défavorable, démontrant le peu de rôle de ces anticorps dans le contrôle tardif de l'infection (Braibant *et al.*, 2008).

Jusqu'à récemment, très peu d'informations étaient disponibles sur la prévalence de la réponse largement neutralisante lors de l'infection naturelle, les facteurs associés au développement de ces anticorps neutralisants ainsi que les épitopes viraux ciblés sur les glycoprotéines d'enveloppe. Alors que l'on pensait qu'une réponse neutralisante de large spectre n'était développée que chez de rares individus, des études récentes ont montré que 10 à 30% des individus développaient des anticorps neutralisants de large spécificité (Stamatatos *et al.*, 2009). En effet, selon les études, la prévalence des individus développant des anticorps largement neutralisants varie de 6% (Nandi *et al.*, 2010), à environ 20% (Doria-Rose *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011b, 2009a; Sather *et al.*, 2009), voire plus de 30% (Doria-Rose *et al.*, 2009; Euler *et al.*, 2010; Mikell *et al.*, 2011; Simek *et al.*, 2009). L'analyse récente de l'activité neutralisante contenue dans les sérums de 1 798 sujets VIH⁺ infectés majoritairement par des virus non-B a montré que 34% de ces individus développaient des anticorps largement neutralisants, et 1% étaient considérés comme « neutraliseurs élités » car présentant une activité neutralisante de large spectre exceptionnelle (titre IC₅₀ ≥ 1 :300) dirigée contre des isolats primaires appartenant à au moins quatre sous-types différents (Simek *et al.*, 2009). Les techniques de neutralisation employées, la durée de l'infection ou encore le sous-type viral peuvent expliquer les différences de prévalence observées. Ces travaux sont d'un très grand intérêt car ils démontrent la capacité du système immunitaire à générer des anticorps neutralisants efficaces contre le VIH-1. Il resterait cependant à mieux

connaître les titres en anticorps neutralisants pré-existants qu'il faudrait atteindre pour protéger efficacement contre une infection (Stamatatos *et al.*, 2009).

- Facteurs associés à l'émergence d'une réponse neutralisante de large spectre

Plusieurs études ont montré que l'étendue de la réponse neutralisante était associée positivement à la durée de l'infection ainsi qu'à la charge virale plasmatique (Braibant *et al.*, 2008; Deeks *et al.*, 2006; Doria-Rose *et al.*, 2010, 2009; Gray *et al.*, 2011b; Mikell *et al.*, 2011; Piantadosi *et al.*, 2009; Sather *et al.*, 2009; van Gils *et al.*, 2009). Deux études récentes ont en effet montré que la prévalence d'individus infectés développant des anticorps neutralisants de large spectre était plus élevée après 4 années d'infection plutôt que 2 ans post-infection (31% versus 20%) (van Gils *et al.*, 2009), et que des anticorps largement neutralisants étaient plus souvent retrouvés chez des sujets virémiques que chez des sujets avirémiques (Doria-Rose *et al.*, 2009). Le nombre de cellules T CD4⁺ semble également jouer un rôle dans le développement de la réponse neutralisante ; toutefois les résultats obtenus sont pour l'heure contradictoires. Les travaux de Gray *et al.*, Euler *et al.*, et Van Gils *et al.* ont montré qu'un faible nombre de cellules CD4⁺ était associé à une réponse neutralisante de large spectre (Euler *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011b; van Gils *et al.*, 2009), alors que d'autres études n'ont pas mis en évidence cette association (Doria-Rose *et al.*, 2010; Piantadosi *et al.*, 2009). De plus, d'autres facteurs comme l'avidité élevée des anticorps anti-Env (Sather *et al.*, 2009), la diversité élevée du gène *env* (Braibant *et al.*, 2008; Piantadosi *et al.*, 2009), ainsi que des marqueurs d'activation spécifique à la surface des cellules T (PD1 à la surface des cellules T CD4⁺) (Mikell *et al.*, 2011) semblent être associés au développement d'une réponse neutralisante de large spectre.

L'activité largement neutralisante des anticorps se développe donc au cours du temps et est favorisée par une stimulation antigénique constante, impliquant une réplication continue du virus. Ces données suggèrent une maturation de la réponse immune au fur et à mesure que le virus se diversifie. Cette maturation résulterait d'une focalisation de la réponse immune cellulaire de type B contre un ou un nombre très limité d'épitopes hautement conservés de l'enveloppe virale, ou serait le résultat de l'émergence et de l'accumulation au cours du temps d'anticorps neutralisants dirigés contre plusieurs régions différentes de l'enveloppe.

- Cibles des anticorps neutralisants de large spectre présents dans les sérums d'individus infectés

Contrairement aux anticorps neutralisants autologues qui ont pour cible les régions variables de l'enveloppe virale, les anticorps neutralisants de large spectre sont dirigés contre des régions de l'enveloppe structurellement conservées au sein des différents sous-types viraux, et pouvant jouer un rôle fonctionnel important dans l'attachement viral et l'entrée dans la cellule cible, telles que les site de liaison au récepteur et corécepteur localisés sur la gp120, et les régions de la gp41 impliquées dans le processus de fusion (**Figure 35**). De nombreux travaux ont récemment été entrepris afin d'explorer les spécificités des anticorps neutralisants contenus dans des sérums largement neutralisants d'individus infectés (Binley *et al.*, 2008; Dhillon *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2011b, 2009a; Li *et al.*, 2007, 2009; Mikell *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011; Nandi *et al.*, 2010; Sather *et al.*, 2009; Tomaras *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010). Ces travaux montrent que l'activité neutralisante de large spectre est dirigée essentiellement contre la gp120. Une activité neutralisante vis-à-vis de la gp41 est observée dans certains sérums mais elle ne constitue en général qu'une fraction mineure de l'activité neutralisante globale. De plus, pour certains sérums, la majorité de l'activité neutralisante ne semble pas dirigée contre les épitopes cibles connus. Des épitopes neutralisants de large spectre restent donc à découvrir et leur identification pourrait apporter de nouvelles informations essentielles pour la conception d'un vaccin contre le VIH (Binley, 2009).

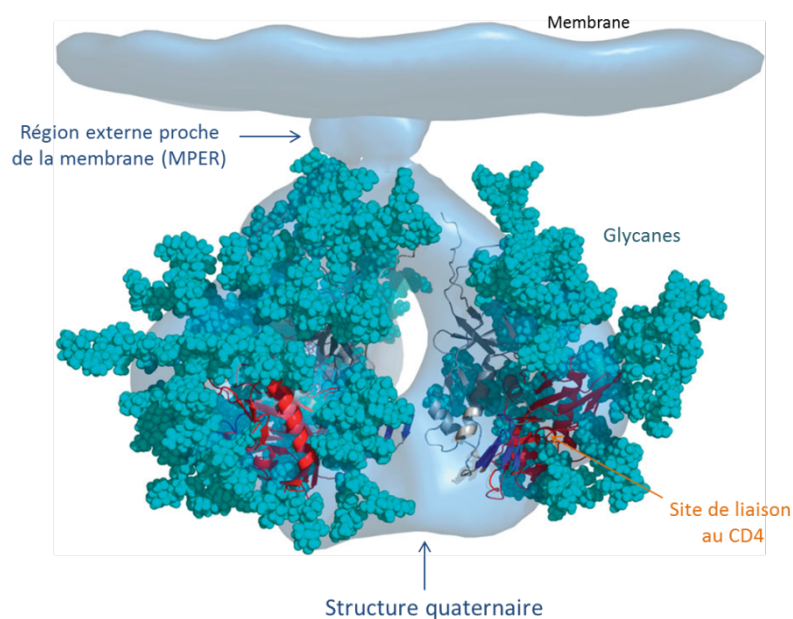


Figure 35. Structure du spicule d'enveloppe du VIH-1. Les régions indiquées par une flèche représentent les régions de l'enveloppe virale ciblées par les anticorps neutralisants largement

neutralisants. Le site de liaison au CD4 est représenté en rouge, les glycanes de l'enveloppe virale en bleu (d'après Nabel *et al.*, 2011).

Une des cibles majeures des anticorps neutralisants est le site de liaison au récepteur CD4 de la gp120 (**Figure 35**). De tels anticorps sont fréquemment détectés dans les sérums largement neutralisants d'individus infectés (Binley *et al.*, 2008; Dhillon *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2007, 2009; Mikell *et al.*, 2011; Nandi *et al.*, 2010; Sather *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009). En effet, plusieurs études ont rapporté la contribution quasi-exclusive d'anticorps dirigés contre le site de liaison au CD4 dans l'activité largement neutralisante contenue dans certains sérums de rares individus chroniquement infectés (Binley *et al.*, 2008; Dhillon *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2007, 2009; Mikell *et al.*, 2011; Nandi *et al.*, 2010; Sather *et al.*, 2009; Scheid *et al.*, 2009, 2011; Tomaras *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011a). Cependant, dans la majorité des cas, les anticorps dirigés contre le site de liaison au CD4 ne contribuent qu'en partie au pouvoir largement neutralisant des sérums (Binley *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2009). La présence d'anticorps dirigés contre le site de liaison au CD4 dans les sérums d'individus infectés ne garantit donc pas une activité neutralisante de large spectre. Ceci est illustré par le nombre limité d'anticorps monoclonaux humains largement neutralisant dirigés contre le site de liaison au CD4 isolé à partir de sérums d'individus chroniquement infectés (b12, HJ16, VRC01-03) (Cf partie III.2.4).

Des anticorps dirigés contre le site de liaison au corécepteur de la gp120 semblent contribuer à l'activité neutralisante de large spectre de certains sérums (Gray *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2009). Ainsi, Gray *et al.* ont mis en évidence une association entre titre en anticorps neutralisants dirigés contre des épitopes CD4-induits (épitopes localisés au niveau du site de fixation aux corécepteurs et exposés après interaction de la gp120 avec le CD4) et activité largement neutralisante contenue dans les sérums d'individus chroniquement infectés (Gray *et al.*, 2009a). Cependant, bien que très immunogène chez les sujets infectés par le VIH-1, le site de liaison au corécepteur n'est exposé que de façon transitoire juste avant la fusion des membranes virale et cellulaire, après la liaison de la gp120 au CD4. L'accessibilité de cette région de l'enveloppe est donc fortement limitée (Decker *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2009a; Labrijn *et al.*, 2003), et il est difficilement envisageable que ces anticorps jouent un rôle majeur dans la protection *in vivo* (Cf partie III.2.4).

La région externe de la gp41 proche de la membrane virale (MPER : membrane-proximal external region) est également très conservée au sein des différents isolats du VIH-1 (**Figure 35**). Le rôle des anticorps anti-MPER n'est pas clairement établi dans la littérature. En effet, alors qu'une étude de Gray *et al.* a mis en évidence une association entre titre en anticorps neutralisants dirigés contre la région MPER de la gp41 et activité largement neutralisante contenue dans les sérums d'individus chroniquement infectés (Gray *et al.*, 2009a), les travaux de Braibant *et al.* n'ont pas mis en évidence d'association entre anticorps anti-MPER et activité neutralisante de large spectre chez des sujets ALT (Braibant *et al.*, 2006). Des anticorps dirigés contre la région MPER ont été détectés dans plusieurs sérums largement neutralisants sans pour autant contribuer à l'activité neutralisante de ceux-ci (Binley *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2011b; Walker *et al.*, 2010). Toutefois, chez de rares individus, des anticorps anti-MPER contribuent partiellement ou en totalité à l'activité neutralisante des sérums (Braibant *et al.*, 2006; Gray *et al.*, 2009b, a; Li *et al.*, 2009; Pietzsch *et al.*, 2010; Sather *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009; Tomaras *et al.*, 2011). Parmi ces anticorps, certains ciblent deux épitopes bien définis de la gp41 reconnus par les anticorps monoclonaux humains largement neutralisants 2F5 (Shen *et al.*, 2009) et 4E10 (Li *et al.*, 2009; Sather *et al.*, 2009), ou de l'anticorps monoclonal HK20 (Sabin *et al.*, 2010).

Plus rarement, des anticorps dirigés contre le bouclier glycanique sont détectés (Gray *et al.*, 2011b; Lavine *et al.*, 2012; Nandi *et al.*, 2010; Tomaras *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010) (**Figure 35**). Ces anticorps dépendent majoritairement du glycane en position 332 (N332) sur la gp120 (Gray *et al.*, 2011b; Tomaras *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010). Des anticorps de type 2G12 (anticorps monoclonal humain largement neutralisant dirigé contre le bouclier glycanique) ont pu être mis en évidence dans certains sérums largement neutralisants (Braibant *et al.*, 2008), et cela à des taux significativement plus élevés que dans des sérums ne montrant pas d'activité neutralisante (Braibant *et al.*, 2006). La contribution directe de ce type d'anticorps dans l'activité neutralisante large des sérums n'a cependant pas encore été démontrée.

La découverte récente de nouveaux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants, PG9 et PG16, ciblant un épitope quaternaire exprimé dans le contexte de la structure trimérique native de la glycoprotéine d'enveloppe (Walker *et al.*, 2009) (**Figure 35**), a permis de mettre en évidence l'existence et la contribution de tels anticorps dans des sérums

d'individus infectés (Gray *et al.*, 2011b; Mikell *et al.*, 2011; Moore *et al.*, 2011; Tomaras *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010). Ces anticorps reconnaissent des épitopes neutralisants quaternaires de type PG9-PG16 (Gray *et al.*, 2011b; Moore *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010) ou alors des structures encore non identifiées (Gray *et al.*, 2011b).

Tous ces travaux ont permis une avancée importante dans l'exploration de la spécificité des anticorps neutralisants contenus dans des sérums largement neutralisants d'individus infectés. Toutefois, une fraction importante des anticorps neutralisants contenus dans certains sérums semblent être dirigés contre des épitopes de l'enveloppe virale encore non identifiés (Binley *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Sather *et al.*, 2009).

En conclusion, toutes les données établies sur les spécificités des anticorps neutralisants contenus dans des sérums d'individus infectés semblent indiquer que seul un nombre très limité d'épitopes à la surface des glycoprotéines d'enveloppe contribuerait à l'activité neutralisante de large spectre de ces sérums (Binley *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2007; Mikell *et al.*, 2011; Scheid *et al.*, 2009; Tomaras *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2010).

III.2.4- Anticorps monoclonaux humains largement neutralisants

Dans les années 1990, quelques anticorps monoclonaux humains neutralisants de large spectre ont été générés à partir de cellules B de rares individus capables de les produire (Mascola & Montefiori, 2010). Ces anticorps monoclonaux, dont les plus anciennement connus b12, 2G12, 4E10 et 2F5, ont pour cible les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 et leur activité protectrice a été démontrée en modèle animal. Au cours des deux dernières années, après plus de 20 ans de recherche, de nouveaux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants ont été identifiés chez des individus présentant une forte et large activité neutralisante : PG9 et PG16 (Walker *et al.*, 2009), VRC01, VRC02 et VRC03 (Wu *et al.*, 2010b) et les anticorps PGT (Walker *et al.*, 2011) (**Figure 36**). Leur identification a été rendu possible par la mise au point de la sélection et de l'amplification *in vitro* de clones de lymphocytes B (Moir *et al.*, 2011; Nabel *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2009). La découverte de ces nouveaux anticorps monoclonaux ouvre de nouvelles portes quant à la mise au point d'un vaccin inducteur d'anticorps neutralisants.

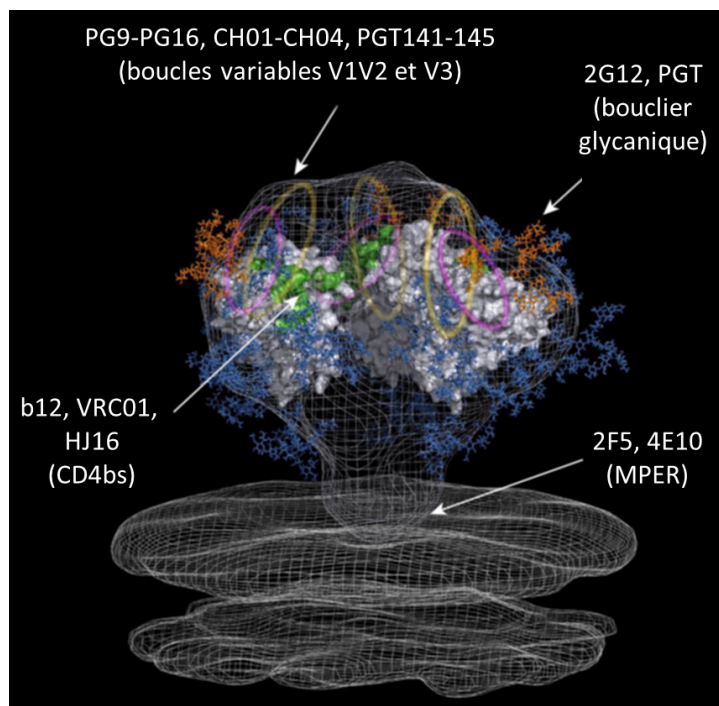


Figure 36. Modélisation de la localisation des épitopes cibles des anticorps monoclonaux humains largement neutralisants sur un trimère de glycoprotéines d’enveloppe. La structure des spicules est issue des données de cryomicroscopie électronique. Les boucles V1V2 et V3 correspondent respectivement aux cercles jaunes et roses. Le site de liaison au CD4 apparaît en vert. Les glycanes apparaissent en périphérie en bleu et orange (en orange, les glycanes impliqués dans l’épitope reconnu par 2G12) (Walker & Burton, 2010).

L’activité neutralisante de ces anticorps monoclonaux a été analysée sur deux panels de 90 et 162 virus appartenant à différents sous-types (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011, 2009) (**Tableau 3**). Au sein des « anciens » anticorps monoclonaux, b12 et 2G12 neutralisent moins de la moitié des virus des panels alors que 2F5 et 4E10 présentent une large neutralisation. Les anticorps monoclonaux récemment isolés présentent une large et forte activité neutralisante en neutralisant un large panel de virus à des concentrations 10 à 100 fois inférieurs à celles des « anciens » anticorps (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011, 2009), d’où l’intérêt important pour ces « nouveaux » anticorps.

	b12	2G12	2F5	4E10	PG9 - PG16	VRC01	« PGT »
Virus							
neutralisés (CI ₅₀ < 50 µg/ml)	34-50%	32-41%	60-67%	98-100%	73-79%	93%	16-78%

Tableau 3. Activité neutralisante des anticorps monoclonaux humains. Pourcentage des virus neutralisés par ces anticorps à une concentration inférieure à 50 µg/ml pour atteindre une inhibition de 50% de l'infectivité (CI₅₀) (d'après Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2011, 2009).

Le descriptif des anticorps monoclonaux suivant leurs épitopes cibles est présenté dans les pages suivantes.

- **Anticorps neutralisants dirigés contre le site de liaison au CD4 : b12, HJ16, VRC01, VRC02 et VRC03**
 - Anticorps neutralisant b12

L'anticorps monoclonal humain largement neutralisant IgG1 b12 a été isolé à partir d'une banque de phages combinatoire établie à partir de cellules B provenant de la moelle osseuse d'un patient séropositif infecté par du VIH-1 de sous-type B en phase asymptomatique d'infection (Barbas *et al.*, 1992; Burton *et al.*, 1991). Cet anticorps reconnaît un épitope conformationnel situé au niveau du site de liaison au CD4 (Burton *et al.*, 1994; Roben *et al.*, 1994). La structure cristallographique de b12, réalisée à partir d'une molécule d'immunoglobuline IgG1 intacte, montre une structure asymétrique avec une région CDRH3 (région déterminant la complémentarité 3 de la chaîne lourde de l'immunoglobuline) inhabituellement longue. Elle est composée de 18 acides aminés alors que cette région en compte habituellement 13 (Burton *et al.*, 2005; Saphire *et al.*, 2001) (**Figure 37**). Cette région CDRH3 protubérante s'apparente à un doigt (finger like) émergeant du fragment Fab (Fragment antigen binding) de l'immunoglobuline afin d'entrer en contact avec l'épitope cible (Saphire *et al.*, 2001). La présence d'un résidu tryptophane au sommet ainsi que de résidus à la base du domaine CDRH3 serait cruciale pour l'interaction b12-gp120 (Zwick *et al.*, 2003).

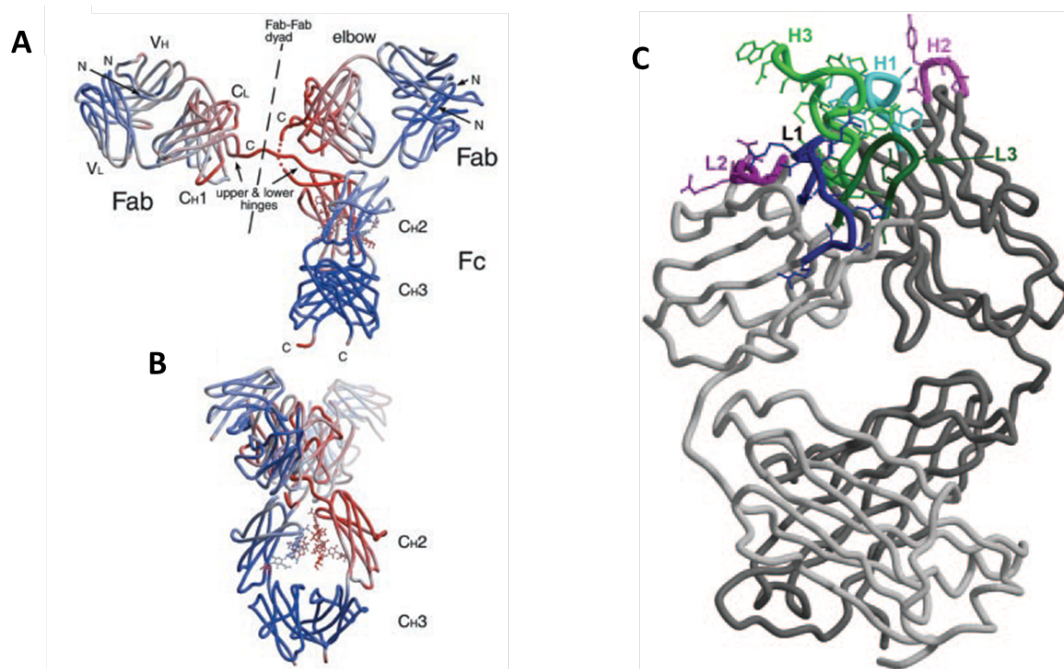


Figure 37. Structure cristallographique de l'anticorps monoclonal IgG1 b12. A et B. Structure cristallographique vue de face (A) et de côté (B; rotation vers la droite de la vue A) de l'anticorps b12 (Saphire *et al.*, 2001). C. Structure cristallographique de paratope de l'anticorps b12. La chaîne légère et la chaîne lourde du fragment Fab de b12 sont représentées en gris clair et gris foncé respectivement. Les régions CDRL1 (bleu foncé), CDRL2 (violet foncé), CDRL3 (vert foncé), CDRH1 (bleu), CDRH2 (violet) et CDRH3 (vert) sont indiquées (Burton *et al.*, 2005).

La structure cristallographique du « core » de la gp120 lié au fragment Fab de l'anticorps b12 (Chen *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2007) a mis en évidence que b12 se lie au domaine externe de la gp120. Cette fixation s'effectue à travers l'interaction des 3 domaines CDR de sa chaîne lourde avec la gp120 et aboutit au recouvrement partiel du site de fixation au CD4 (Zhou *et al.*, 2007). Contrairement aux théories précédentes (Burton *et al.*, 1994), la longue région CDRH3 de la chaîne lourde de b12 ne s'insère pas dans la cavité Phe43 du site de liaison au CD4 mais semble se fixer autour de cette cavité (Zhou *et al.*, 2007).

L'étude de tomographie cryoélectronique de Liu *et al.* décrit les changements conformationnels du trimère d'enveloppe induits par la fixation de l'anticorps b12 sur la gp120 (Liu *et al.*, 2008) (**Figure 38**). L'interaction de b12 avec son épitope entraîne une ouverture partielle du spicule avec une rotation des monomères de gp120 d'environ 20-25° autour de l'axe perpendiculaire à la membrane virale (Liu *et al.*, 2008). Cette ouverture du trimère induite par b12 est proche de celle observée après attachement au récepteur CD4. La rotation des monomères s'opère autour d'un même axe de rotation et dans une direction similaire dans les deux contextes. En revanche, les changements conformationnels sont deux

fois plus importants suite à l'attachement au CD4. En effet, la liaison CD4-gp120 entraîne une rotation des monomères de gp120 d'environ 45° par rapport à l'axe central du trimère, une projection hors du plan de 15° et un déplacement du centre de gravité d'environ 15Å (Liu *et al.*, 2008). Par conséquent, l'anticorps monoclonal largement neutralisant b12 reconnaît le site de fixation au récepteur CD4 mais induit une conformation du trimère différente de celle observée après attachement au récepteur (Liu *et al.*, 2008).

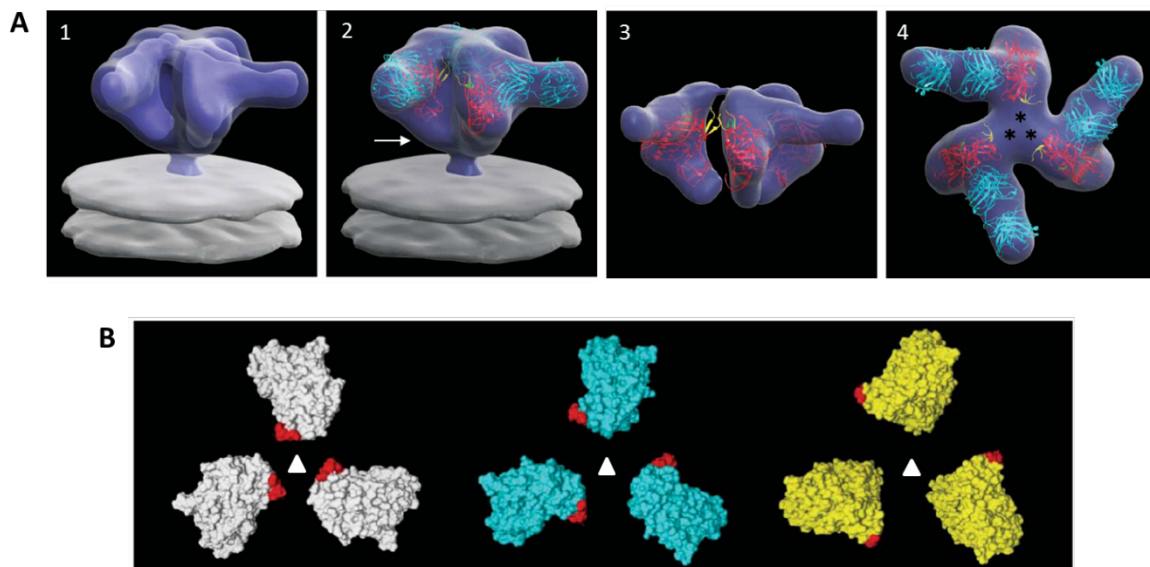


Figure 38. Structure du spicule d'enveloppe du VIH-1 lié au fragment Fab de l'anticorps b12.
A. Carte de densité du spicule d'enveloppe liée au fragment Fab (1). Vue de face (2-3) et vue de dessus (4) du spicule liée à b12. Les structures cristallographiques du fragment Fab de l'anticorps b12 et du noyau de la gp120 sont représentées en bleu et en rouge respectivement. L'emplacement probable des boucles variables V1V2 et de la gp41 est représenté par des astérisques (4) et une flèche blanche (2) respectivement. **B.** Conformation du spicule d'enveloppe du VIH-1 non liée (blanc) et déplacement des monomères de gp120 suite à la fixation de l'anticorps b12 (bleu) ou du récepteur CD4 et de l'anticorps 17b (jaune). La localisation de la base des boucles V1V2 est indiquée en rouge (Liu *et al.*, 2008).

L'activité neutralisante de l'anticorps monoclonal b12 a été étudiée *in vitro* sur deux panels de virus composés de 90 et 162 virus pseudotypés de différents sous-types. b12 neutralise 35 à 50% de ces isolats avec une concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) < 50µg/ml. Soixante à 70% des virus de sous-type B, 30 à 60% des virus de sous-type C et 30% des virus de sous-type AE sont neutralisés (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2009). Des travaux récents ont décrits les mécanismes de résistance de variants du VIH-1 résistants à l'anticorps b12 (Bunnik *et al.*, 2010c; Duenas-Decamp *et al.*, 2008; Utachee *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2009). La glycosylation semble avoir un impact important dans la résistance à b12. En effet, Utachee *et al.* a mis en

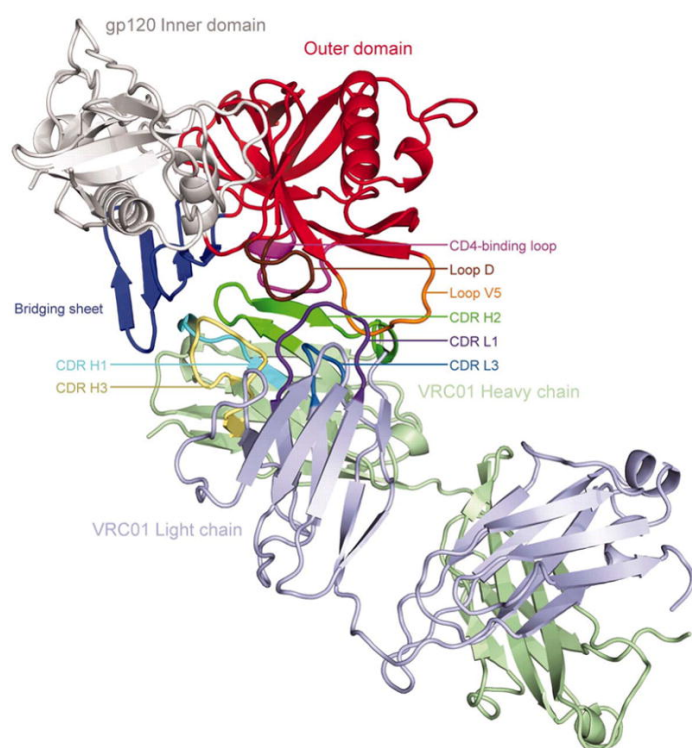
évidence le rôle de deux PNGS, N186 dans V2 et N197 dans C2, dans la résistance à la neutralisation par b12 pour des virus de sous-type CRF01_AE (Utachee *et al.*, 2010). De même, le PNGS en position 386 (jonction du domaine constant C4 et de la boucle variable V4) associé une arginine en position 373 (domaine constant C4), localisés à proximité du site de liaison au CD4, contribueraient à la résistance à b12 en empêchant la liaison b12-gp120 par encombrement stérique (Duenas-Decamp *et al.*, 2008). Enfin, des virus présenteraient une résistance à b12 malgré de faibles variations au sein de la zone de contact b12-gp120 (Wu *et al.*, 2009).

- Anticorps neutralisants HJ16, VRC01-03

Très récemment, de nouveaux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants dirigés contre le site de liaison au CD4 viennent d'être isolés. Il s'agit des anticorps HJ16 et des anticorps VRC01, VRC02 et VRC03 (Corti *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010b; Zhou *et al.*, 2010). L'anticorps neutralisant HJ16 a été isolé à partir de cellules B mémoires d'un individu infecté par un isolat de sous-type C dont le sérum présentait une large activité neutralisante (Balla-Jhagjhoorsingh *et al.*, 2011; Corti *et al.*, 2010). Cet anticorps reconnaît un nouvel épitope à proximité du site de liaison au CD4 différent de celui reconnu par b12. HJ16 présente une activité neutralisante similaire à b12, en neutralisant respectivement 36% et 47% des virus d'un panel de 90 virus de différents sous-type (Corti *et al.*, 2010).

Les anticorps VRC01, VRC02 et VRC03, dirigés contre le site de liaison au CD4, ont été isolés à partir des cellules B d'un individu en utilisant une glycoprotéine d'enveloppe recombinante qui permet d'isoler des anticorps interagissant spécifiquement avec le site de liaison au CD4. Les gènes d'immunoglobulines des anticorps spécifiques de l'épitope ont ensuite été amplifiés et exprimés à partir des cellules B d'intérêt (Nabel *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010b). Cet individu, infecté par un virus de sous-type B, était connu pour présenter une large activité neutralisante dirigée contre le site de liaison au CD4 (Li *et al.*, 2007). Les anticorps VRC01 et VRC02 sont des variants somatiques d'un même clone IgG1. Contrairement à b12, les anticorps VRC01-03 ne possèdent pas une longue région CDRH3. En effet, ce domaine compte 14 acides aminés pour les anticorps VRC01 et VRC02 et 16 acides aminés pour l'anticorps VRC03 (Wu *et al.*, 2010b). La structure cristallographique du fragment Fab de l'anticorps VRC01 lié au « core » de la gp120 a été résolue récemment (Zhou *et al.*, 2010). VRC01 interagit avec le site de liaison au CD4 de la gp120

principalement via la région CDRH2. D'autres régions de la glycoprotéine de surface, telles que la boucle D (en position N-terminale de la boucle V3) et la région variable V5, joueraient également un rôle dans la liaison et la neutralisation par VRC01 (Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010) (**Figure 39**). L'interaction VCR01-gp120 entraîne des changements de conformation au sein du monomère de la gp120 similaire à ceux induit par le récepteur CD4. Toutefois, dans le contexte du spicule d'enveloppe natif, l'anticorps VRC01 interagit avec la gp120 d'une manière distincte de celle du CD4 (Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010)



Les anticorps VRC01 et VRC02 présentent une forte et large activité neutralisante en neutralisant 91% des virus de différents sous-types d'un panel qui en compte 190. L'anticorps VRC03 neutralise 57% de ces virus alors que l'anticorps b12 en neutralise uniquement 41% ($IC_{50} < 50 \mu g/ml$). L'activité neutralisante exceptionnelle des anticorps VRC01 et VRC02 est confirmée pour des $CI_{50} < 1 \mu g/ml$: les anticorps VRC01, VRC02, VRC03 et b12 neutralisant respectivement 72%, 75%, 39% et 17% des virus d'un même panel (Wu *et al.*, 2010b) (**Figure 40**). Certains virus de ce panel présentent une résistance naturelle à l'anticorps VRC01. Des mutations au sein de la boucle D, de la région variable V5 et du site de liaison au CD4 diminueraient la liaison et la neutralisation par VRC01. Cependant, dans la plupart des cas, des altérations multiples plutôt qu'une unique substitution seraient nécessaires pour

conférer une résistance complète à VRC01 (Li *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2010). Les études récentes de Wu *et al.* et Scheid *et al.* ont mis en évidence que l'immunité largement neutralisante associée à des anticorps de type VRC01 impliquait une évolution et une maturation essentielle pour l'affinité de ces anticorps (Scheid *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011a).

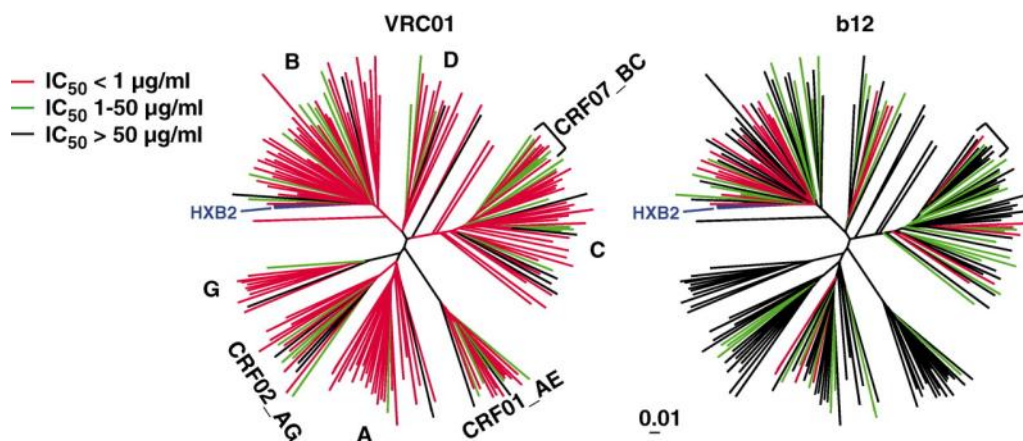


Figure 40. Activité neutralisante des anticorps VRC01 et b12 sur un panel de 190 virus de différents sous-types. L'arbre phylogénétique représentatif des 190 virus a été réalisé par neighbor-joining. Les virus résistants à la neutralisation par VRC01 et b12 ($CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$) sont représentés en noir ; les virus sensibles à VRC01 et b12 sont indiqués en vert ($CI_{50} : 1-50 \mu\text{g/ml}$) et rouge ($CI_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$) (Wu *et al.*, 2010b).

- **Anticorps neutralisant dirigé contre le bouclier glycanique : 2G12 et PGT121-123, 125-128, 130, 131, 135-137**
 - Anticorps 2G12

L'anticorps monoclonal humain 2G12 a été isolé à partir d'un mélange de PBMC de sujets séropositifs asymptomatiques (Buchacher *et al.*, 1994; Trkola *et al.*, 1996). L'anticorps 2G12 est unique de par sa capacité à cibler le bouclier glycanique a priori non immunogène de l'enveloppe virale (Hoxie, 2010). En effet, cet anticorps reconnaît un épitope conformationnel impliquant des N-glycanes localisés sur la face dite « silencieuse » de la gp120. Il se lie aux extrémités mannose $\alpha 1 \rightarrow 2$ de glycanes de type oligomannose ($\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$) présents au niveau du domaine externe de la gp120 (Calarese *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2002; Scanlan *et al.*, 2007, 2002; Trkola *et al.*, 1996) (**Figure 42**). L'épitope cible est composé de 3 PNGS en position 295, 332 et 392, jouant un rôle critique dans la reconnaissance par 2G12. Deux PNGS additionnels en position 339 et 386 semblent jouer un rôle indirect dans la liaison de

l'anticorps à l'épitope cible (Dacheux *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2002; Scanlan *et al.*, 2002) (**Figure 42**). La structure cristallographique de l'anticorps 2G12 a révélé une conformation inhabituelle. En effet, les fragments Fab se présentent sous forme dimérisée grâce à un échange de domaines des régions variables des chaînes lourdes. Cet échange inhabituel ajoute aux deux sites de fixation conventionnels (VL-VH) un troisième site correspondant à l'interface VH-VH, impliqué dans l'interaction multivalente avec les oligosaccharides conservés de la gp120 (Calarese *et al.*, 2003). Cette structure inhabituelle permet une interaction de plus forte affinité qu'un anticorps classique (Calarese *et al.*, 2003; Doores *et al.*, 2010b) (**Figure 42**).

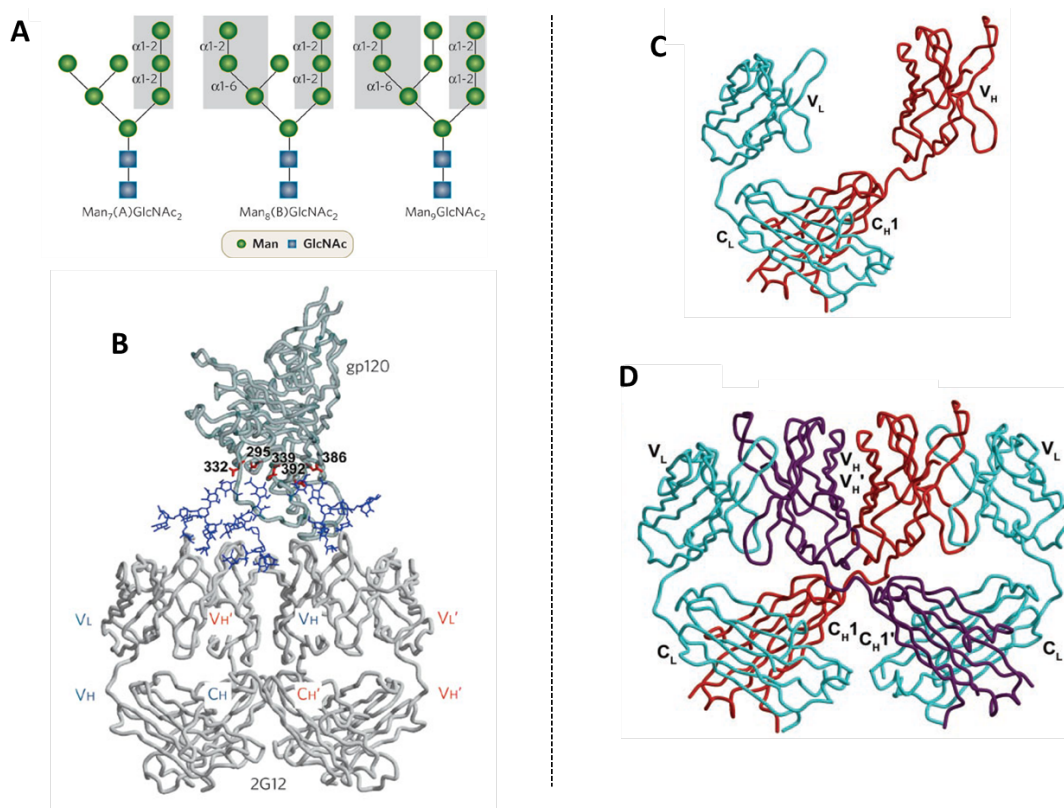


Figure 41. Epitope et structure cristallographique de l'anticorps 2G12. **A.** Motifs glycosidiques reconnus par l'anticorps 2G12. 2G12 se lie aux extrémités mannose $\alpha 1 \rightarrow 2$ de glycanes de type oligomannose présents à la surface de l'enveloppe virale. **B.** Modèle de fixation de l'anticorps 2G12 sur la gp120. L'épitope cible est composé de 5 PNGS en position 295, 332 et 392, 339 et 386 sur la gp120 (Scanlan *et al.*, 2007). **C.** Structure cristallographique d'un monomère Fab de l'anticorps 2G12. La chaîne légère et la chaîne lourde du fragment Fab sont représentées en bleu et rouge respectivement. **D.** Structure cristallographique dimérisée des deux fragments Fab de l'anticorps 2G12, révélant ainsi la conformation inhabituelle de la structure de l'anticorps. Les chaînes légères sont représentées en bleu alors que les chaînes lourdes des deux Fab sont représentées en rouge (Fab1) et en violet (Fab2) (Calarese *et al.*, 2003).

L'activité neutralisante de 2G12 sur deux panels de 90 et 162 virus a montré que cet anticorps neutralise 30 à 40% des isolats ($CI_{50} < 50\mu\text{g/ml}$). Cependant, la neutralisation par 2G12 semble dépendante du sous-type viral. En effet, cet anticorps neutralise 70% des virus de sous-type B alors que les virus de sous-types C et CRF01_AE présentent au contraire une forte résistance à la neutralisation (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2009). Une étude de Gray *et al.* a montré que l'absence du résidu asparagine (Asn) en position 295 dans la plupart des virus de sous-type C contribuerait à la résistance à la neutralisation. Cependant il a été montré que ce n'était pas le seul déterminant impliqué, suggérant des différences structurales entre les virus de sous-type C et les virus d'autres sous-types (Gray *et al.*, 2007b). Pour les virus de sous-type CRF01_AE, il semblerait que l'absence du PNGS en position N332 jouerait un important dans la résistance à 2G12 (Binley *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2011). De plus, des déterminants moléculaires autres que les glycanes cibles, pourraient être impliqués de manière directe ou indirecte dans la neutralisation par 2G12. Il a récemment été montré que des déterminants de la gp120, localisés à proximité du site de liaison au CD4, entraînaient une modification de glycanes cibles de 2G12, altérant ainsi la sensibilité à la neutralisation par 2G12 (Duenas-Decamp & Clapham, 2010). De plus, un PNGS additionnel en position 302 au sein de la boucle V3 ou une région variable V1V2 plus longue et/ou plus glycosylée diminuerait de manière significative la sensibilité à 2G12 (Chaillon *et al.*, 2011).

- Anticorps PGT121-123, 125-128, 130, 131, 135-137

Une étude récente de Walker *et al.* a rapporté la découverte de 17 nouveaux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants dont 12 sont dirigés contre des épitopes glycanes-dépendant (Walker *et al.*, 2011). Ils neutralisent 16 à 72% des virus d'un panel de 162 virus représentatifs des différents sous-types circulants ($IC_{50} < 50\mu\text{g/ml}$), avec des concentrations en moyenne 10 fois plus faible que pour les anticorps PG9 et VRC01, et jusqu'à 100 fois plus faible que pour les quatre premiers anticorps monoclonaux largement neutralisants décrits (b12, 2G12, 2F5 et 4E10) (Walker *et al.*, 2011).

Ces anticorps se lient à la gp120 et entrent tous en compétition avec l'anticorps monoclonal dirigé contre le bouclier glycanique 2G12. De plus, l'épitope de tous ces anticorps, exceptés les anticorps PGT 135-137, semble être situé à proximité ou contigu à la boucle variable V3. Les anticorps PGT125-128, 130 et 131 se lient spécifiquement à des glycanes de types $\text{Man}_8\text{-}_9\text{GlcNac}_2$, et reconnaissent un épitope dépendant des N-glycanes N332 et/ou N301,

directement impliqué dans la formation de l'épitope cible. Les anticorps PGT 121-123 reconnaissent quant à eux des glycanes de type mannose, et ciblent un épitope dépendant du glycan N332. Les structures cristallographiques du fragment Fab de deux de ces anticorps monoclonaux largement neutralisants, PGT127 et PGT128, lié à un glycan synthétique Man₈₋₉ ainsi qu'à une structure composée du domaine externe de la gp120 délété de la région V3 ont été décrites (Pejchal *et al.*, 2011) (**Figure 42**). Ces deux anticorps se lient aux glycanes N332 et N301, ainsi qu'à un segment C-terminal de la boucle V3, qui contribuent à la forte affinité de liaison et à la large spécificité de PGT127 et 128. L'épitope de PGT128 est accessible et exposé dans le contexte de l'enveloppe trimérique. La forte activité neutralisante des anticorps PGT127 et PGT128 pourrait s'expliquer par une liaison à l'enveloppe virale impliquant plusieurs spicules (Pejchal *et al.*, 2011).

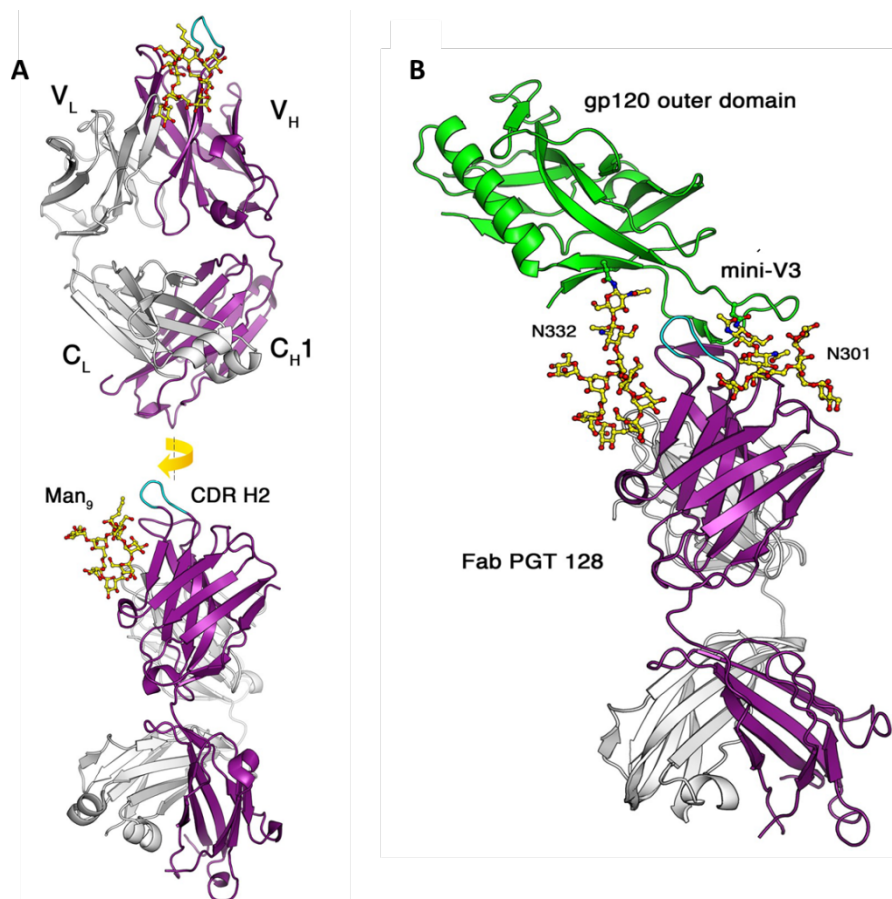


Figure 42. Structure cristallographique de fragment Fab de l'anticorps PGT128. A. Structure cristallographique de fragment Fab de PGT128 lié à un glycan synthétique Man₉. La chaîne légère et la chaîne lourde du Fab sont représentées en gris et violet respectivement, et la boucle CDRH2 est indiquée en bleu. Le glycan Man₉ est représentée en jaune. B. Structure cristallographique du fragment Fab de PGT128 en complexe le domaine externe glycosylé de la gp 120. Le fragment Fab est représenté comme dans la figure A. le domaine externe de la gp120 est représenté en vert, et les glycanes N301 et N332, reconnus par l'anticorps PGT128, sont indiqués en jaune (Pejchal *et al.*, 2011).

- **Anticorps neutralisants dirigés contre la gp41 : 2F5, 4E10**

Bien que la majorité de l'ectodomaine de la gp41 soit recouvert par la sous-unité de surface gp120, une région proche de la membrane virale composée des 24 acides aminés C-terminaux de l'ectodomaine de la gp41, la région MPER (Montero *et al.*, 2008), reste néanmoins accessible aux anticorps neutralisants comme en témoigne la capacité des anticorps 2F5 et 4E10 à neutraliser des isolats de différents sous-types (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2009). Ces anticorps, isolés à partir de cellules B immortalisées de patients infectés, ciblent des épitopes linéaires adjacents très conservés dans la partie distale de la région heptamérique en hélice 2 (HR-2) de la région MPER (Muster *et al.*, 1993; Zwick *et al.*, 2001) (**Figure 43**). Ces anticorps accèderaient à leur épitope après la liaison entre la gp120 et les récepteurs, lors de la fusion des membranes virale et cellulaire. Les modifications conformationnelles alors induites seraient nécessaires à la formation ou à l'accessibilité des épitopes de 2F5 et 4E10 (Montero *et al.*, 2008). Néanmoins, une étude récente propose un modèle dans lequel les épitopes de la région MPER seraient « formés » avant la liaison gp120-CD4, mais l'inaccessibilité des anticorps 2F5 et 4E10 serait due à des contraintes locales ou à distance due à la structure quaternaire du spicule d'enveloppe (Chakrabarti *et al.*, 2011).

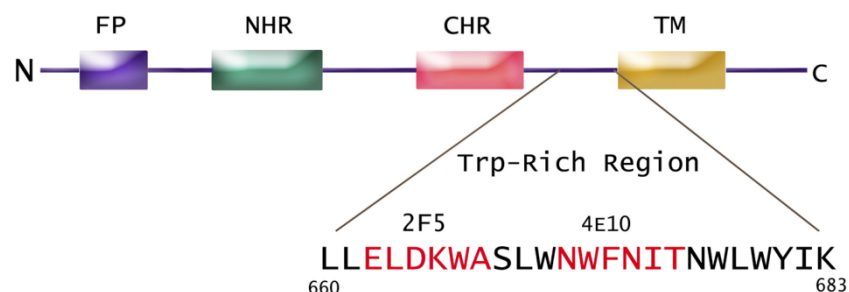


Figure 43. Représentation schématique de la gp41 et des séquences cibles des anticorps 2F5 et 4E10. Les régions fonctionnelles de la gp41 sont représentées : le peptide de fusion (FP : violet), les régions constituées de séquences heptamériques répétées en position C- et N- terminales (NHR et CHR : vert et rouge) et la région transmembranaire (TM : jaune). Les épitopes cibles des anticorps monoclonaux 2F5 et 4E10 (indiqués en rouge) sont localisés dans une région riche en tryptophane au sein de la région MPER (Cardoso *et al.*, 2005).

- Anticorps neutralisant 2F5

L'anticorps neutralisant 2F5 reconnaît la séquence protéique ELDKWA (acides aminés 662 à 667) dont les résidus DKW jouent un rôle prépondérant dans la fixation de l'anticorps (Muster *et al.*, 1993; Zwick *et al.*, 2005). La structure cristallographique du fragment Fab de l'anticorps 2F5 associé à sa séquence peptidique cible illustre la conformation étendue non-hélicoïdale avec un coude β de la région DKW du peptide cible (Julien *et al.*, 2008; Ofek *et al.*, 2004). Les résidus impliqués dans cette interaction correspondent à des acides aminés chargés alors que l'autre face du peptide, essentiellement hydrophobe, semble être en contact avec une autre région de la gp41 ou avec la membrane plasmique (Montero *et al.*, 2008). De plus l'anticorps 2F5 est caractérisé par une longue région CDRH3 hydrophobe de 22 acides aminés (**Figure 44**). Toutefois, seuls 10 acides aminés à la base de cette longue région CDRH3 sont impliquée dans l'interaction entre l'anticorps 2F5 et son épitope cible de la gp41, le sommet quant à lui semble être très mobile aussi bien lorsque que le fragment Fab est sous forme libre ou associé à son épitope (Julien *et al.*, 2008; Ofek *et al.*, 2004). Cette longue région CDRH3 assure une grande flexibilité et une probable réactivité avec la membrane lipidique via des interactions hydrophobes comme le montre le modèle établi par Julien *et al.* (Julien *et al.*, 2008, 2010) (**Figure 44**).

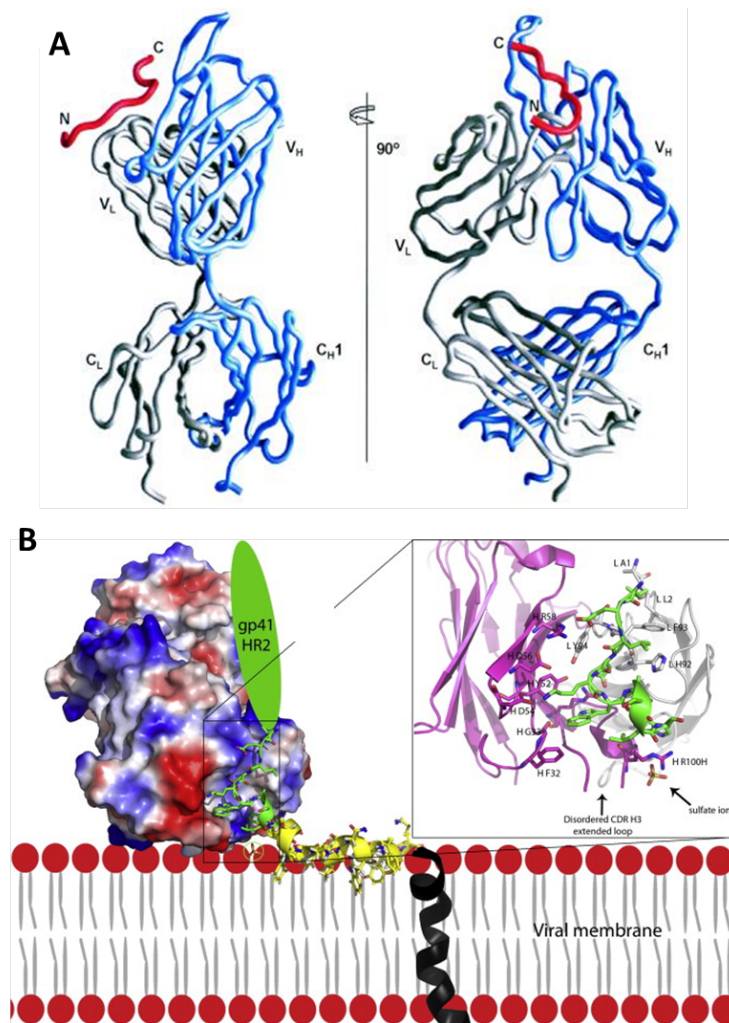


Figure 44. Structure du fragment Fab de l'anticorps 2F5 et interaction avec l'épitope cible. A. Structure cristallographique des chaînes lourde (bleu) et légère (gris) de fragment Fab de l'anticorps 2F5 liées à un peptide cible (rouge) (Ofek *et al.*, 2004). **B.** Modèle d'interaction entre l'anticorps 2F5 (représenté en surface moléculaire) et la région MPER de la gp41 du VIH-1. L'épitope de 2F5 est représenté en vert, et la partie C-terminale de la région MPER de la gp41 en jaune. L'anticorps 2F5 se lie avec son épitope cible via des interactions impliquant des résidus chargés positivement du fragment Fab. La boucle mobile du long domaine CDRH3 serait orientée vers la membrane et interagirait avec des composants de la bicouche lipidique ou avec d'autres régions de la gp41 localisées dans ou à proximité de la membrane virale (Julien *et al.*, 2008).

L'activité neutralisante de l'anticorps 2F5 sur deux panels de 90 et 162 virus a montré que cet anticorps neutralise environ 60% des isolats ($CI_{50} < 50\mu g/ml$). Une forte activité neutralisante est observée pour les virus de sous-type B (70 à 80% de virus neutralisés) et CRF01_AE (90-100% des virus neutralisés) alors que les virus de sous-type C ne sont pas ou très peu neutralisés (0 à 7%) (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2009). La forte résistance à la neutralisation des virus de sous-type C s'expliquerait par un polymorphisme au niveau du motif DKW, ces virus présentant un motif DSW (Binley *et al.*, 2004).

- Anticorps neutralisant 4E10

L'anticorps 4E10 reconnaît un épitope linéaire de séquence NWFDIT (acides aminés 671 à 676) en position C-terminale de la séquence ciblée par 2F5 (Zwick *et al.*, 2001). Des études de mutagenèse ont mis en évidence le rôle essentiel de trois résidus, Trp₆₇₂, Phe₆₇₃ et Thr₆₇₆ dans la liaison avec l'anticorps 4E10 (Brunel *et al.*, 2006), alors que les résidus Trp₆₇₂, Phe₆₇₃ et Trp₆₈₀, le dernier étant localisé à l'extrémité C-terminale de l'épitope (NWFDITNWLW), sont impliqués dans la sensibilité à la neutralisation par 4E10 (Zwick *et al.*, 2005). Comme pour 2F5, ces données suggèrent que l'attachement de 4E10 à la gp41 implique des résidus autres que ceux de la séquence MPER (Montero *et al.*, 2008). La structure cristallographique du fragment Fab de l'anticorps 4E10 associé à sa séquence peptidique cible a mis en évidence une conformation en hélice de l'épitope de 4E10 une fois fixé par l'anticorps (Cardoso *et al.*, 2005) (**Figure 45**). L'interaction entre l'anticorps et l'épitope cible se fait via le motif WFXIT dans lequel le résidu Trp₆₇₂, crucial pour l'infectivité du virus, joue un rôle prépondérant, et le résidu X ne tient pas un rôle majeur dans l'attachement de 4E10 (Cardoso *et al.*, 2005). Le paratope de l'anticorps 4E10 possède deux régions, CDRH3 et CDRH2, fortement hydrophobes. La région CDRH3, longue de 18 acides aminés, interagit avec le peptide cible via deux acides aminés seulement, localisés à la base de la boucle CDRH3. Le sommet de la boucle est essentiellement constitué de résidus apolaires qui forment une structure hydrophobe plate probablement impliquée dans des interactions avec la membrane virale (Cardoso *et al.*, 2005; Montero *et al.*, 2008) (**Figure 45**).

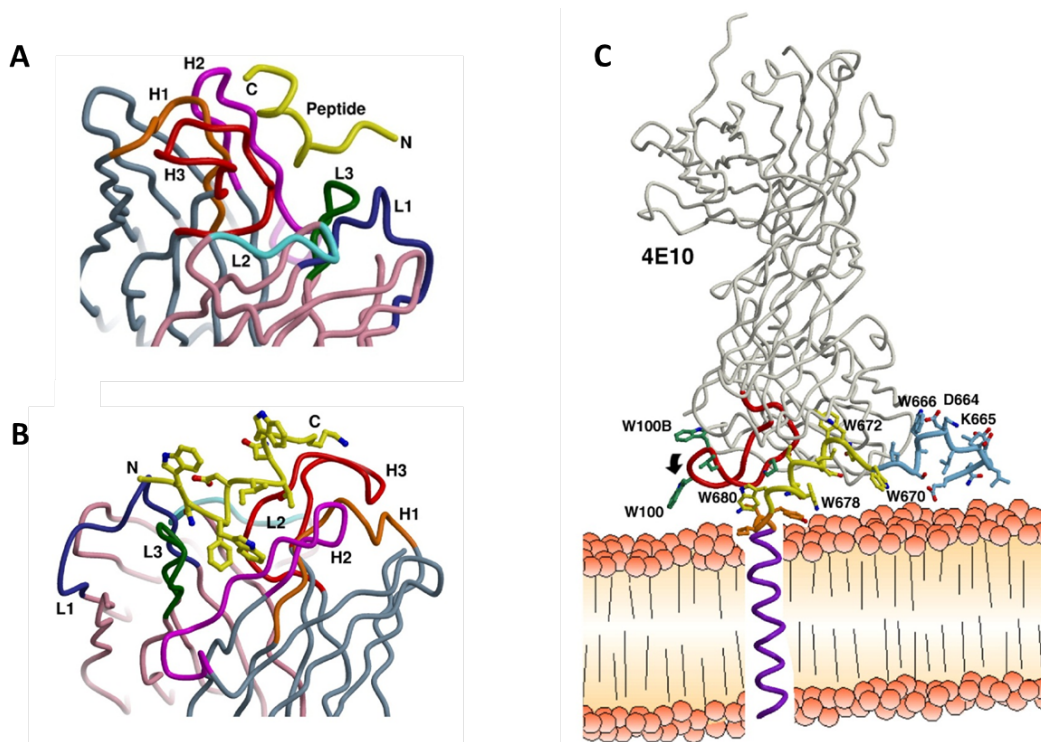


Figure 45. Structure de l'anticorps 4E10 et interaction avec l'épitope cible. A et B. Structure des régions CDR de l'anticorps 4E10 liées à un peptide cible. Les régions CDRL1 (bleu foncé) et CDRL3 (vert) de la chaîne légère (rose) ainsi que les régions CRDH1 (orange), CDRH2 (violet) et CDRH3 (rouge) de la chaîne lourde (gris) entrent en contact avec le peptide cible (jaune). La région CDRL2 (bleu clair) n'interagit pas avec le peptide. C. Modèle d'interaction entre l'anticorps 4E10 (gris) et la région MPER de la gp41. Le peptide cible (jaune) et la région CDRH3 (rouge avec les chaînes latérales en vert) sont situés à proximité de la surface de la membrane virale (Cardoso *et al.*, 2005).

L'activité neutralisante de l'anticorps 4E10 sur deux panels de 90 et 162 virus a montré que cet anticorps présentait une neutralisante de large spectre en neutralisant quasiment 100% des isolats de tous les sous-types représentés ($CI_{50} < 50\mu\text{g/ml}$) (Binley *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2009). Le motif WFXIT, extrêmement bien conservée au sein des isolats du VIH, explique la capacité de l'anticorps 4E10 à neutraliser un large nombre d'isolats viraux (Montero *et al.*, 2008). Deux études ont néanmoins rapporté des cas de résistance naturelle à l'anticorps 4E10. Gray *et al.* a mis en évidence chez un enfant infecté par du VIH de sous-type C, un clone résistant à la neutralisation par 4E10 dû à une substitution F673L dans la région MPER (Gray *et al.*, 2008). Le rôle de cette substitution dans la résistance à 4E10 a été confirmée dans l'étude de Nakamura *et al.*, dans laquelle 4 individus présentaient un rare polymorphisme naturel au niveau de la région MPER (F₆₇₃ et W₆₈₀) conférant une résistance à 4E10 (Nakamura *et al.*, 2010).

L'attachement des anticorps monoclonaux largement neutralisants 2F5 et 4E10 sur leurs épitopes est de plus grande affinité lorsque ces épitopes sont associés à la membrane plasmique (Alam *et al.*, 2007). Cette observation supporte donc l'hypothèse d'une réactivité de ces deux anticorps neutralisants avec la membrane lipidique via des interactions avec leur longs domaines CDRH3 hydrophobes (**Figures 44 et 45**). De plus, une étude de Haynes *et al.* suggère que les anticorps 2F5 et 4E10 sont polyspécifiques de par leur liaison à des auto-antigènes phospholipidiques tels que les cardiolipides et peuvent être considérés comme des auto-anticorps (Haynes *et al.*, 2005). L'association entre anticorps anti-cardiolipide et anticorps anti-MPER a été confirmée *in vivo* au cours de l'infection naturelle (Martinez *et al.*, 2009).

- **Anticorps neutralisants dirigés contre un épitope quaternaire de la gp120 : PG9 et PG16, CH01-CH04, PGT141-145**

- Anticorps neutralisants PG9 et PG16

Les anticorps PG9 et PG16 ont été générés à partir de lymphocytes B d'un donneur asymptomatique infecté par des virus de sous-type A dont le sérum présentait une activité neutralisante de large spectre exceptionnelle (Simek *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009). Une méthode de neutralisation à haut-débit a été utilisée afin de « screener » les surnageants de culture de 30 000 cellules B pour leur activité neutralisante. Les gènes d'immunoglobulines des anticorps largement neutralisants identifiés ont ensuite été amplifiés et exprimés à partir des cellules B d'intérêt (Kwong *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2009). Les anticorps PG9 et PG16, qui sont des variants somatiques, reconnaissent un épitope quaternaire exprimé exclusivement sur la glycoprotéine d'enveloppe trimérique, constitué essentiellement de résidus localisés dans les régions conservées des boucles variables V1V2 et V3 de la gp120. Les anticorps PG9 et PG16 sont sensibles de façon similaire à des substitutions spécifiques au sein des boucles variables V1V2, alors que PG16 est plus sensible que PG9 aux substitutions localisées dans la boucle V3 (Walker *et al.*, 2009). Ces deux anticorps, issus de variants somatiques, présentent une région CDRH3 exceptionnellement longue de 28 acides aminés, faisant d'eux les domaines les plus longs parmi les anticorps humains décrits à ce jour (Pancera *et al.*, 2010b; Pejchal *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2009).

La structure cristallographique du fragment Fab de l'anticorps PG16 a mis en évidence que ce long domaine CDRH3 formait un sous-domaine stable unique qui dominait la surface de l'anticorps (**Figure 46**). Une tyrosine sulfatée au sein de ce domaine jouerait un rôle dans la liaison et la neutralisation par PG9 et PG16. Une structure similaire est retrouvée pour l'anticorps PG9 par modélisation (Pancera *et al.*, 2010b; Pejchal *et al.*, 2010). Ce domaine CDRH3 seul de l'anticorps PG16 neutraliserait de façon efficace des isolats de différents sous-types, confirmant le rôle important de la région CDRH3 dans la liaison à l'épitope cible (Liu *et al.*, 2011b). Une étude récente de McLellan *et al.* a décrit la structure du fragment Fab de l'anticorps PG9 lié au domaine V1V2 de la gp120. Le long domaine CDRH3 de PG9 serait capable de pénétrer le bouclier glycanique. La liaison entre PG9 impliquerait des interactions avec les glycanes N156/N173 et N160 et le feuillet C du domaine V1V2 (McLellan *et al.*, 2011).

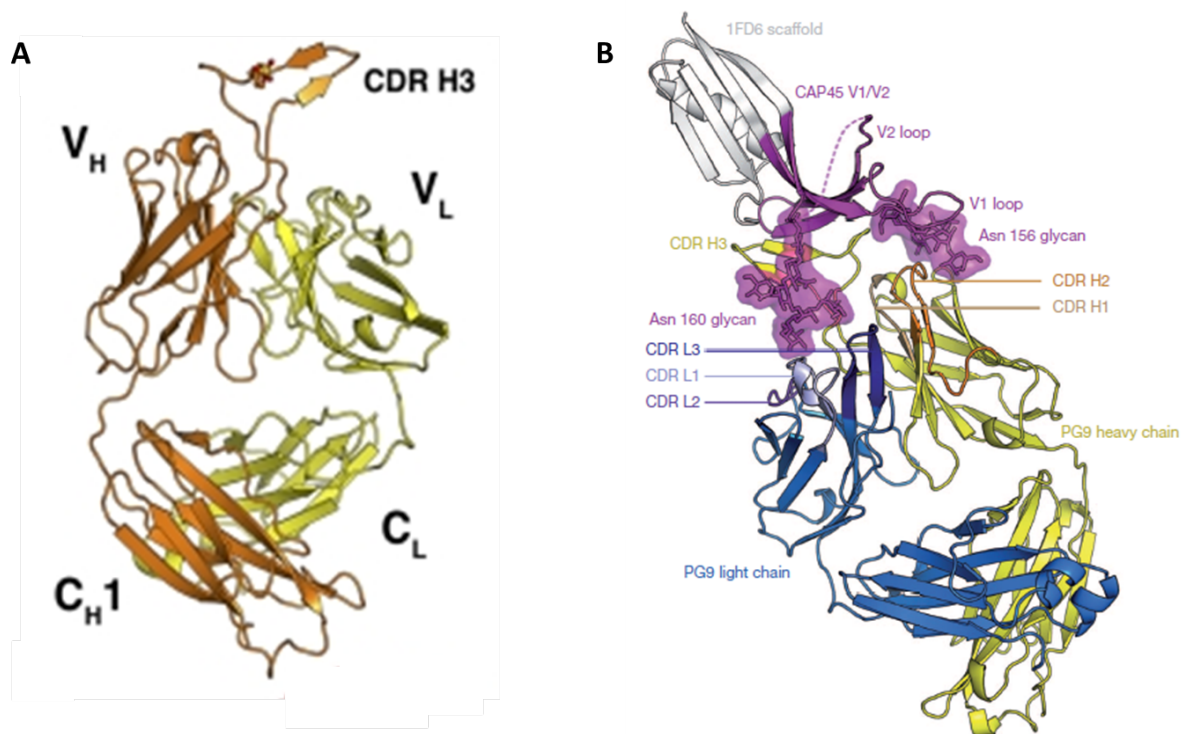


Figure 46. Structures cristallographiques des fragments Fab des anticorps PG16 et PG9. A. Structure cristallographique du fragment Fab de l'anticorps PG16. Les chaînes lourde et légère sont représentées en orange et jaune respectivement. La région CDRH3 de la chaîne lourde est exceptionnellement longue et forme un sous-domaine qui domine la surface de l'anticorps (Pejchal *et al.*, 2010). **B.** Structure cristallographique du fragment Fab de l'anticorps PG9 lié au domaine V1/V2. Le domaine V1/V2 ainsi que les glycanes N156 et N160 sont représentés en violet. Les chaînes lourdes et légères de PG9 sont représentées en jaune et bleu respectivement (McLellan *et al.*, 2011).

L'activité neutralisante de PG9 et PG16 sur deux panels de 80 et 162 virus de différents sous-types a démontré la large et forte activité neutralisante de ces deux anticorps monoclonaux. En effet, PG9 et PG16 neutralisent 70 à 80% des isolats (Walker *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011b) à des concentrations 10 à 100 fois plus faibles que pour les quatre anticorps monoclonaux humains largement neutralisants précédemment décrits b12, 2G12, 2F5 et 4E10 (Walker *et al.*, 2009). Un large panel de mutants alanine de l'enveloppe de sous-type B JR-CSF a permis d'identifier des résidus impliqués dans la sensibilité à la neutralisation par PG9 et PG16, et de mettre en évidence le rôle important de la glycosylation dans la sensibilité à la neutralisation par ces deux anticorps (Doores & Burton, 2010; Walker *et al.*, 2009). En effet, la substitution lysine/acide glutamique en position 168 (K168E) localisée dans la boucle variable V2, est impliquée dans la résistance à PG9 et PG16 dans une souche de référence de sous-type B (Doores & Burton, 2010; Walker *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011b). En effet, une tyrosine sulfatée sur le résidu 100H de PG9 entre en interaction avec le résidu en position 168 de la boucle V2 lorsque celui-ci est une arginine ou une lysine, mais serait repoussé par un acide glutamique (McLellan *et al.*, 2011). La neutralisation par PG9 et PG16 est dépendante de sites potentiels de glycosylation de la gp120. Walker *et al.* et Doores *et al.* ont en effet mis en évidence que la substitution des glycanes N156 et N160 (V1V2) dans deux souches de sous-type B influençaient fortement la sensibilité à la neutralisation (Doores & Burton, 2010; Walker *et al.*, 2009). L'impact du glycanes N160 dans la neutralisation par PG9 et PG16 a été confirmé dans une étude récente de Wu *et al.* sur un panel de 80 virus pseudotypés de sous-type A, B et C (Wu *et al.*, 2011b).

○ Anticorps CH01-CH04

Les quatre anticorps neutralisants CH01-CH04 ont été isolés à partir des cellules B mémoires d'un individu africain chroniquement infecté par une souche de sous-type A (Bonsignori *et al.*, 2011). Ces anticorps, issus d'une même lignée clonale, reconnaissent un épitope conformationnel au niveau des régions V2 et V3 de type PG9-PG16, exposé préférentiellement mais pas exclusivement sur la glycoprotéine d'enveloppe trimérique. L'activité neutralisante des anticorps CH01-CH04 sur un panel de 91 virus de différents sous-types a montré que les anticorps CH01, CH02, CH03 et CH04 neutralisaient respectivement 46%, 36%, 45% et 45% des isolats (Bonsignori *et al.*, 2011).

- Anticorps PGT141-145

Récemment, de nouveaux anticorps monoclonaux largement neutralisants, PGT141-145, ont été isolés à partir de cellules B d'individus présentant une activité neutralisante exceptionnelle (Walker *et al.*, 2011). Ces anticorps reconnaissent des épitopes exprimés sur l'enveloppe trimérique de type PG9 et PG16. Ils neutralisent 38 à 78% des virus d'un panel de 162 virus représentatifs des différents sous-types circulants ($IC_{50} < 50\mu g/ml$), avec des concentrations équivalentes que pour les anticorps PG9 et VRC01, et en moyenne 10 fois plus faible que pour les quatre premiers anticorps monoclonaux largement neutralisants décrits (b12, 2G12, 2F5 et 4E10).

III.3- Activité protectrice *in vivo* des anticorps largement neutralisants

- Anticorps neutralisants et immunité stérilisante

Le rôle protecteur des anticorps monoclonaux largement neutralisants b12, 2G12, 2F5 et 4E10 dans l'infection par le VIH-1 dans des modèles animaux a été mis en évidence *in vivo* dans de nombreuses études d'immunisation passive aussi bien chez des souris SCID (souris atteintes d'une immunodéficience combinée sévère, reconstituées avec des tissus lymphoïdes humains) (Gauduin *et al.*, 1997; Parren *et al.*, 1995; Poignard *et al.*, 1999) que chez des primates non humains (Hessell *et al.*, 2009b, 2010; Mascola *et al.*, 1999, 2000; Parren *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 1999). Administrés individuellement ou mélangés avant une épreuve virulente, ces anticorps protègent de l'infection des macaques lors d'épreuves virulentes par des virus chimères SHIV réalisées par voies intraveineuse (Mascola *et al.*, 1999; Shibata *et al.*, 1999), vaginale (Hessell *et al.*, 2009a, b; Mascola *et al.*, 2000; Parren *et al.*, 2001), rectale (Hessell *et al.*, 2010) ou orale (Baba *et al.*, 2000; Ferrantelli *et al.*, 2003), y compris vis-à-vis de virus SHIV contenant une enveloppe d'isolat primaire R5.

La plupart des essais d'immunisation passive suggèrent que seule l'administration de concentrations très élevées d'anticorps monoclonaux neutralisants permettrait d'observer une protection totale, de l'ordre par exemple de 25mg/kg de b12, atteignant ainsi des concentrations plasmatiques de l'ordre de 75 fois celle requise pour inhiber la réplication virale à 90% (IC_{90}) *in vitro* dans des cellules mononuclées du sang périphérique, et de 3 000 fois celle nécessaire pour inhiber la réplication virale à 50% (IC_{50}) dans des tests de

neutralisation utilisant des virus pseudotypés (Hessell *et al.*, 2007; Parren *et al.*, 2001). Cependant, une étude récente montre que cette évaluation aurait été surestimée du fait d'une charge virale très élevée dans l'inoculum utilisé lors de l'épreuve virulente (« challenge ») pour obtenir l'infection des macaques en une seule administration. Cependant il est bien établi que lors de la transmission humaine par voie sexuelle, les taux de transmission par acte sont faibles et dépendent de la charge virale du sujet infecté, suggérant que l'inoculum viral est relativement faible au cours de la transmission naturelle. La transmission du VIH nécessiterait donc très vraisemblablement des expositions répétées à de plus faibles quantités de virus (Hessell *et al.*, 2009a). Cette étude montre en effet que des concentrations plasmatiques d'anticorps b12 plus faibles de l'ordre de seulement 5 IC₉₀ (dans des tests avec PBMC) ou 200 IC₅₀ (tests utilisant des virus pseudotypés), atteintes et maintenues par l'administration répétée de seulement 1 mg/kg de b12 par semaine, permettent de protéger les macaques exposés de manière itérative à de plus faibles doses de SHIV administrées par voie vaginale. Ces concentrations en anticorps neutralisants sont proches, voire même en dessous de celles qui sont décrites dans les sérums largement neutralisants de sujets infectés, suggérant que de tels titres en anticorps neutralisants pourraient être obtenus avec des immunogènes appropriés (Dhillon *et al.*, 2007; Doria-Rose *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007, 2009; Sather *et al.*, 2009). Une étude similaire du même groupe a également montré une protection avec l'anticorps monoclonal 2G12 à concentration physiologique (Hessell *et al.*, 2009b).

L'activité de large spectre des anticorps utilisés est liée à la spécificité des fragments Fab. Toutefois, une étude de Hessell *et al.* a mis en lumière l'implication des fonctions effectrices dans la protection complète de macaques face à une infection vaginale (Hessell *et al.*, 2007). En effet, l'introduction de mutations dans le fragment constant (Fc) de l'anticorps b12 a permis de déterminer la contribution des différentes fonctions effectrices de l'anticorps dans l'immunité stérilisante. L'anticorps b12 et le mutant KA (perte de la fonction de fixation du C1q du complément) protègent de manière similaire des macaques d'une épreuve virulente (8/9) alors que le mutant LALA (perte de la fonction de fixation au récepteur par le fragment Fc de l'immunoglobuline, ainsi que la fixation des agents du complément) ne protège que 5 animaux sur 9. L'effet protecteur de l'anticorps b12 est donc réduit lorsque cet anticorps est dépourvu de sa capacité de liaison au récepteur Fc, ce qui suggère que les fonctions effectrices des anticorps neutralisants contribuent à la protection *in vivo* (Hessell *et al.*, 2007).

Il est probable que la découverte des derniers anticorps monoclonaux très neutralisants « série VRC » et « série PG » amènera à de nouveaux essais de protection dans les modèles animaux.

- Anticorps neutralisants et thérapeutique

L'effet des anticorps neutralisants sur la charge virale lors d'une infection VIH-1 établie a été étudié chez 14 sujets en phase chronique ou aiguë d'infection par l'administration d'un cocktail d'anticorps monoclonaux neutralisants (2G12, 2F5 et 4E10) après interruption du traitement antiviral (Trkola *et al.*, 2005). Ces anticorps n'ont permis de contrôler l'infection chez aucun des sujets infectés. Seul un retard sur la réapparition du virus suite à l'arrêt du traitement a été observé chez certains d'entre eux, ce qui démontre l'activité limitée *in vivo* des anticorps administrés une fois l'infection établie. L'inefficacité dans le contrôle de la réplication virale est liée à l'émergence de mutants d'échappement témoignant d'une pression de sélection exercée par les anticorps, notamment 2G12 (Manrique *et al.*, 2007; Trkola *et al.*, 2005).

Ces travaux démontrent que si une immunité protectrice complète est possible lorsque des anticorps neutralisants sont présents à des quantités suffisantes avant l'infection, ce n'est pas le cas une fois que l'infection est établie, le virus s'étant diversifié au préalable et échappant ainsi à ces anticorps neutralisants.

IV- Transmission mère-enfant du VIH-1

La transmission mère-enfant est la principale cause d'infection à VIH chez l'enfant. En 2009, on estimait à 2,5 millions le nombre d'enfants de moins de 15 ans vivant avec le VIH dans le monde, à 370 000 les enfants nouvellement infectés, et à 260 000 les enfants décédés des suites de l'infection (Rapport annuel 2010 de l'ONUSIDA). La transmission du virus de la mère à l'enfant peut se produire à trois périodes: lors de la grossesse (transmission *in utero*), lors du travail et de l'accouchement (transmission intrapartum ou peripartum), ou après l'accouchement lors de l'allaitement (Scarlatti, 1996). En l'absence de traitement antirétroviral, la transmission mère-enfant du VIH peut intervenir dans 15 à 25% des cas lorsque la mère n'allait pas. Ce risque est augmenté à 30 à 45% dans les pays aux ressources limitées où il n'y a peu ou pas d'alternative à l'allaitement (Lehman & Farquhar, 2007). La mise en place d'une prophylaxie antirétrovirale a permis de réduire le risque de transmission à moins de 2% dans les pays industrialisés ou émergents (Lallemant *et al.*, 2004; McIntyre, 2006; Thorne & Newell, 2003).

IV.1- Modes de transmission et mécanismes

La majorité des cas de transmissions se produisent dans les derniers temps de la grossesse ou lors de l'accouchement (45 à 50% des infections), alors que les transmissions intervenant pendant la grossesse ou au cours de l'allaitement maternel comptent respectivement pour 15-20% et 30-40% des infections (Cavarelli & Scarlatti, 2011). Les différents mécanismes de transmission sont décrits dans les pages suivantes.

IV.1.1- Transmission *in utero*

La majorité des cas de transmission *in utero* se produit dans les dernières semaines de la grossesse (Kourtis *et al.*, 2001; Rouzioux *et al.*, 1995). Cependant, le virus a été détecté dans des tissus fœtaux lors du premier et second trimestre, démontrant ainsi qu'une transmission précoce du virus au cours de la grossesse pouvait avoir lieu (Brossard *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1990; Mano & Chermann, 1991a). La transmission *in utero* se fait par passage du virus à travers le placenta, composé d'une double couche de cellules polarisées: les

cytotrophoblastes et les syncytiotrophoblastes. Il forme une barrière entre la circulation sanguine maternelle et fœtale, est le site des échanges entre la mère et le fœtus au cours du développement fœtal, et protège le fœtus contre de nombreux pathogènes (Fuchs & Ellinger, 2004; Gude *et al.*, 2004). Au cours de la grossesse, les cellules trophoblastiques sont en contact étroit avec des cellules infectées ou des particules virales libres provenant de la circulation sanguine maternelle. Plusieurs études ont montré que le VIH était capable d'infecter des trophoblastes *in vitro* (David *et al.*, 1992; Lagaye *et al.*, 2001; Mano & Chermann, 1991b; Mognetti *et al.*, 2000; Vidricaire *et al.*, 2007, 2004) et *in vivo* (Menu *et al.*, 1999; Zachar *et al.*, 1999). Toutefois, les mécanismes d'entrée ne sont pas élucidés à ce jour étant donné que les trophoblastes expriment les corécepteurs CXCR4 et CCR5 mais peu ou pas le récepteur CD4 (Mognetti *et al.*, 2000). Différents mécanismes de transmission ont été décrits *in vitro*. Les particules virales libres seraient rapidement et massivement internalisées par endocytose par une voie indépendante des interactions gp120/CD4 (Al-Harthi *et al.*, 2002; Vidricaire *et al.*, 2007, 2004, 2003), conduisant à une transcytose du virus vers le pôle basolatéral des cellules ou à une réplication virale au sein des trophoblastes (Vidricaire *et al.*, 2004). L'interaction de cellules infectées du sang maternel (PBMC) avec des cellules trophoblastiques entraînerait soit un bourgeonnement de particules virales au site de contact suivi du mécanisme de transcytose sans réplication virale à travers la barrière trophoblastique, soit une fusion des PBMC avec les cellules trophoblastiques conduisant à une réplication du virus et à une production de nouveaux virions au pôle basal des cellules (Lagaye *et al.*, 2001). Des particules virales libres ou des cellules infectées de la circulation maternelle pourraient également directement atteindre la circulation fœtale à travers des brèches au sein de la barrière placentaire (Cavarelli & Scarlatti, 2011; Scarlatti, 2004) (**Figure 47A**). De plus, les molécules DC-SIGN et ICAM-1 ont été décrites comme jouant un rôle dans le passage du virus entre les cellules placentaires et les cellules de Hofbauer ou les lymphocytes T présents dans la circulation fœtale (Arias *et al.*, 2003; Geijtenbeek *et al.*, 2001).

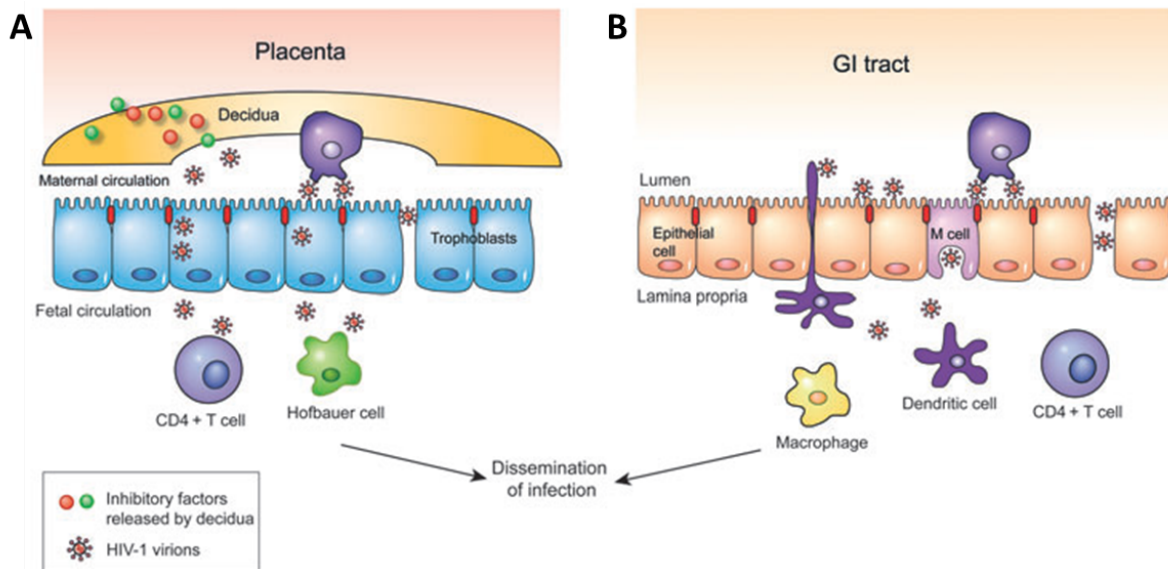


Figure 47. Mécanismes de transmission virale de la mère au fœtus/enfant. Lors de la transmission *in utero*, le virus traverse la barrière placentaire pour atteindre la circulation fœtale (A). Lors de l'accouchement ou de l'allaitement maternel, des particules virales ou des cellules infectées sont ingérées par le nouveau-né et atteignent le tractus digestif (B). Dans les deux cas, la transmission virale se ferait via des brèches au niveau des tissus, par infection directe de cellules ou par transcytose de particules virales. Au niveau du placenta, un équilibre de cytokines et de chimiokines semble influencer l'infection des cellules trophoblastiques (Cavarelli & Scarlatti, 2011).

IV.1.2- Transmission intrapartum

En absence de toute prévention, la transmission intrapartum du VIH-1 représente 45 à 50% des infections du nouveau-né. La mère peut transmettre le virus à son enfant lors du travail ou de l'accouchement. Lors du travail, les contractions utérines entraîneraient des micro-transfusions entre la circulation sanguine maternelle et fœtale (Kwiek *et al.*, 2006), et la rupture des membranes conduirait à une infection ascendante du vagin au liquide amniotique et au fœtus (Thorne & Newell, 2003). Lors de l'accouchement, le nouveau-né se contaminerait lors de son passage dans le canal génital du fait de son exposition au sang et aux sécrétions cervico-vaginales contenant des particules libres ou des cellules infectées (Gardella *et al.*, 2011; Loussert-Ajaka *et al.*, 1997; Mostad & Kreiss, 1996; Thorne & Newell, 2003). Des études comparatives menées sur le mode d'accouchement (césarienne *versus* accouchement par voie naturelle) ainsi que sur des grossesses gémellaires ont permis de conforter l'hypothèse selon laquelle le passage par le canal génital représenterait la source principale de contamination du nouveau-né. En effet, la pratique d'une césarienne avant rupture des membranes diminue le risque de transmission du virus à l'enfant (European

Collaboratory Study *et al.*, 2010; Kind *et al.*, 1998; Mandelbrot *et al.*, 1998; The European Mode of Delivery Collaboration, 1999). Lors de grossesses gémellaires, il a été montré, sans toutefois être confirmé (Biggar *et al.*, 2003), que le premier jumeau présentait plus de risques de contamination que le second jumeau (Bulterys *et al.*, 1992; Duliège *et al.*, 1995; Goedert *et al.*, 1991). De plus, la présence du virus a été mise en évidence au cours de deux études, dans environ 28% et 41% des aspirations gastriques et oropharyngées prélevées chez des nouveau-nés à la naissance (Ait-Khaled *et al.*, 1998; Mandelbrot *et al.*, 1999), témoignant d'une réelle exposition des enfants à l'infection virale lors de leur passage dans la filière génitale. Les sécrétions génitales ingérées peuvent atteindre formations lymphoïdes associées à la muqueuse intestinale (Kourtis *et al.*, 2003).

IV.1.3- Transmission post-partum

Les mécanismes de transmission via l'allaitement sont peu connus. Au cours de l'allaitement, l'enfant est continuellement exposé à de fortes quantités de particules virales libres ou de cellules infectées au niveau de la muqueuse du tractus digestif. Le virus présent dans le lait des mères infectées peut provenir soit de particules virales libres de la circulation sanguine libérées dans le lait maternel, soit d'une réplication locale dans des macrophages (Bulterys *et al.*, 2010; Kourtis *et al.*, 2003). La transmission virale se ferait via des brèches ou par transcytose au niveau de l'épithélium du tractus digestif. Les cellules M des plaques de Peyer de l'épithélium digestif pourraient être impliquées dans le passage des virus de la lumière intestinale aux cellules lymphoïdes intraépithéliales (Cavarelli & Scarlatti, 2011). De plus, il a été montré *in vivo* et *in vitro*, que les cellules dendritiques pouvaient pénétrer à travers les jonctions serrées des entérocytes et favoriser ainsi le transport viral à partir de la lumière intestinale (Cavarelli & Scarlatti, 2011) (**Figure 47B**).

IV.2- Transmission mère-enfant du VIH-1 et anticorps neutralisants

Contrairement à la transmission sexuelle, la transmission verticale se fait en présence d'anticorps neutralisants pré-existants chez l'enfant du fait du passage transplacentaire d'IgG maternelles. Ainsi, la transmission mère-enfant du VIH-1 est un modèle naturel permettant d'explorer le rôle des anticorps neutralisants dans la protection vis-à-vis de l'infection, tout particulièrement lorsque la transmission se fait tardivement (transmission intrapartum).

L'enfant est alors exposé au virus en présence d'anticorps maternels passifs dont certains ont une activité neutralisante de plus ou moins large spectre.

IV.2.1- Le goulet d'étranglement (« genetic bottleneck »)

Un certain nombre d'études portant sur l'analyse de la diversité de la quasi-espèce virale au sein de paires mère-enfant ont montré que, malgré la présence d'une population virale hétérogène chez la mère, la population virale de l'enfant est homogène et restreinte génétiquement, suggérant la transmission d'un unique variant maternel. La transmission mère-enfant représenterait donc un goulet d'étranglement, ou « genetic bottleneck », aboutissant à la transmission d'un nombre limité de variants viraux maternels pour l'établissement d'une nouvelle infection chez l'enfant (Ahmad *et al.*, 1995 ; Briant *et al.*, 1995 ; Dickover *et al.*, 2001 ; Kishko *et al.*, 2011 ; Kwiek *et al.*, 2008 ; Pasquier *et al.*, 1998 ; Renjifo *et al.*, 2003 ; Russell *et al.*, 2011 ; Samleerat *et al.*, 2008 ; Scarlatti *et al.*, 1993a ; Wolinski *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 2010). Ces données suggèrent donc une pression de sélection dans laquelle les anticorps neutralisants maternels pourraient jouer un rôle important. Cependant, dans certains cas, des enfants sont occasionnellement infectés par une population hétérogène suite à la transmission de plusieurs variants (Briant *et al.* 1995 ; Dickover *et al.*, 2001 ; Kishko *et al.*, 2011 ; Kwiek *et al.*, 2008 ; Lamers *et al.*, 1994 ; Pasquier *et al.*, 1998 ; Renjifo *et al.*, 2003 ; Russell *et al.*, 2011 ; Samleerat *et al.*, 2008 ; Scarlatti *et al.*, 1993a ; Verhofstede *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2010a). Le **tableau 4** dresse le bilan des différents travaux, en terme de nombre d'enfants présentant une population virale hétérogène comparé au nombre d'enfants infectés par une population virale homogène.

Il a été suggéré que la période de transmission pouvait être responsable de différences dans la diversité de la population virale chez l'enfant. Les enfants infectés *in utero* pourraient être infectés aussi bien par un ou plusieurs variants maternels (Dickover *et al.*, 2001 ; Renjifo *et al.*, 2003 ; Verhofstede *et al.*, 2003 ; Russell *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2010a), tandis que les enfants infectés lors de la transmission intrapartum ou peripartum, en présence de taux élevés d'anticorps maternels, présenteraient majoritairement une population homogène (Dickover *et al.*, 2001, Kishko *et al.*, 2011 ; Verhofstede *et al.*, 2003 ; Russell *et al.*, 2011). Toutefois, dans certaines études la période de transmission n'est pas précisée ou n'est pas clairement définie (Ahmad *et al.*, 1995 ; Briant *et al.*, 1995 ; Lamers *et al.*, 1994 ; Pasquier *et al.*, 1998 ; Wolinski *et al.*, 1992), et il est parfois difficile de discerner les cas de transmission *in utero*

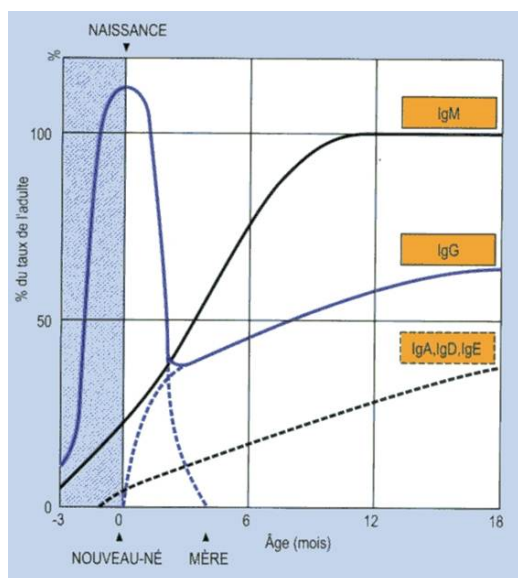
qui interviendraient dans les derniers moments de la grossesse des cas de transmission intrapartum ou de transmission causée par un allaitement précoce (Cavarelli & Scarlatti, 2011).

Auteur	Nombre de paires	Enfants infectés par		Période de transmission	Pays
		Population hétérogène	Population homogène		
Ahmad <i>et al.</i> , 1995	7	0 %	100 %	np	USA
Briant <i>et al.</i> , 1995	4	25 %	75 %	np	France
Dickover <i>et al.</i> , 2001	23	26 %	74 %	iu ; ip (allaitement -)	USA
Kishko <i>et al.</i> , 2011	5	40 %	60 %	ip (allaitement -)	USA
Kwiek <i>et al.</i> , 2008	47	42 %	58 %	iu ; ip (allaitement np)	Malawi
Lamers <i>et al.</i> , 1994	3	67 %	33 %	np	USA
Pasquier <i>et al.</i> , 1998	4	25 %	75 %	np	France
Renjifo <i>et al.</i> , 2003	53	21 %	79 %	iu	Tanzanie
Russell <i>et al.</i> , 2011	19	32 %	68 %	iu ; ip (allaitement np)	Malawi
Samleerat <i>et al.</i> , 2008	17	18 %	82 %	iu ; ip (allaitement -)	Thaïlande
Scarlatti <i>et al.</i> , 1993a	10	20 %	80 %	iu ; (ip, allaitement np)	Italie
Verhofstede <i>et al.</i> , 2003	13	54 %	46 %	iu ; ip (allaitement +)	Kenya
Wolinsky <i>et al.</i> , 1992	3	0 %	100 %	np	USA
Zhang <i>et al.</i> , 2010a	6	17 %	83 %	ip ; allaitement	Zambie

Tableau 4. Etude de la population virale de l'enfant infecté par le VIH-1. Récapitulatif des différentes études menées sur le « genetic bottleneck ». Le mode de transmission est précisé: *in utero* (iu), intrapartum (ip), allaitement ou non précisé (np). La présence (+) ou l'absence (-) de l'allaitement chez les mères est indiqué.

IV.2.2. Rôle des anticorps neutralisants dans la transmission mère-enfant

Les anticorps neutralisants maternels sont parmi les facteurs de sélection potentiellement responsables de ce goulet d'étranglement. Les IgG maternelles peuvent traverser la barrière placentaire et atteindre la circulation sanguine fœtale. Des taux élevés d'anticorps maternels sont détectés chez le fœtus en fin de grossesse et peuvent protéger l'enfant d'infections vis-à-vis de nombreux pathogènes (Englund *et al.*, 1998; Safrit *et al.*, 2004) (**Figure 48**).



La transmission mère-enfant constitue ainsi un modèle naturel permettant d'étudier le rôle des anticorps passifs présents chez l'enfant avant une exposition au virus, et donc leur rôle dans la protection vis-à-vis de l'infection à VIH. Cependant, les résultats obtenus sont assez contradictoires, liés en grande partie à la méthodologie. Certaines études ont mis en évidence le rôle des anticorps neutralisants maternels dans la réduction de la transmission mère-enfant, en démontrant que la présence ou des titres élevés en anticorps neutralisants étaient plus fréquemment détectés chez des mères qui ne transmettent pas le virus à leur enfant que chez les mères transmetteuses (Barin *et al.*, 2006; Bongertz *et al.*, 2002; Lathey *et al.*, 1999; Scarlatti *et al.*, 1993b). Au contraire, d'autres études n'ont pas observé de différences ni dans le titre ni dans le spectre de la réponse neutralisante entre les sérums des mères qui transmettent et celles qui ne transmettent pas le VIH (Bongertz *et al.*, 2001; Guevara *et al.*, 2002; Hengel *et al.*, 1998; Husson *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 2011). Une étude récente menée sur le rôle des anticorps passifs chez des enfants exposés au virus durant l'allaitement suggérait que la puissance et l'étendue de la réponse anticorps hétérologue chez les enfants exposés au virus ne prédisait pas la protection vis-à-vis de l'infection (Lynch *et al.*, 2011a).

Les travaux de Wu *et al.*, Dickover *et al.* et Zhang *et al.* ont montré de manière convaincante que les virus transmis à l'enfant étaient en général des variants résistants à la neutralisation par les anticorps maternels. Alors que la population virale maternelle était composée de variants sensibles et résistants à la neutralisation autologue, les variants transmis présentaient une résistance élevée à la neutralisation par le plasma maternel (Wu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010b). De plus, une analyse phylogénétique de variants viraux de mères et d'enfants a montré que les variants transmis étaient phylogénétiquement proches des variants maternels échappant à la neutralisation autologue (Dickover *et al.*, 2006). Cependant, deux études récentes n'ont pas observé de différences dans la sensibilité à la neutralisation par les anticorps maternels entre les virus transmis et les virus maternels (Kishko *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011).

IV.2.3. Caractéristiques des virus transmis

Très peu d'études se sont penchées sur les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des virus transmis de la mère à l'enfant. Certaines études ont cependant comparé les caractéristiques autres que la sensibilité à la neutralisation des gènes d'enveloppe des variants maternels et des virus transmis à l'enfant. Deux études, réalisées sur des virus de sous-type A et C, ont montré que les variants transmis à l'enfant possédaient des boucles variables plus courtes et moins glycosylées que les virus de la mère, suggérant que des virus avec une enveloppe plus courte et moins glycosylée seraient sélectionnés lors de la transmission mère-enfant (Russell *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010a). Au contraire, aucune différence dans la longueur et la glycosylation des gènes *env* n'a été observée entre les variants transmis et les variants maternels au sein de paires mère-enfant infectés par des virus de sous-type B et CRF01_AE (Kishko *et al.*, 2011; Samleerat *et al.*, 2008). Ces résultats discordants suggèrent, de manière similaire à ce qui est observé lors de la transmission horizontale, que les propriétés moléculaires liées à la transmission pourraient être spécifiques du sous-type viral (Chohan *et al.*, 2005; Derdeyn *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2005). L'étude des caractéristiques fonctionnelles des virus transmis à l'enfant a suggéré une association entre la transmission du VIH-1 à l'enfant et la capacité répliquative des virus transmis (Kong *et al.*, 2008) sans toutefois être confirmée (Kishko *et al.*, 2011). Le clivage et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les virions ne sembleraient pas être associés à la transmission mère-enfant du VIH (Zhang *et al.*, 2010b).

IV.2.4. Activité protectrice *in vivo* des anticorps neutralisants dans le contexte de la transmission mère-enfant

Des expériences d'immunisation passive dans des modèles animaux ont permis de démontrer le rôle des anticorps dans la protection de macaques nouveau-nés vis-à-vis d'une infection par des virus SIV ou SHIV (Lohman-Payne *et al.*, 2010). L'immunisation de femelles macaques gestantes avec une souche de SIV entraînerait un transfert trans-placentaire des anticorps produits aboutissant à une protection partielle de macaques nouveau-nés contre une épreuve virulente à la naissance par la même souche de SIV (Van Rompay *et al.*, 1996). Un modèle d'infection par le SHIV chez des macaques nouveau-nés mimant la transmission intrapartum du virus via l'exposition aux muqueuses a été établi (Baba *et al.*, 1994). L'administration passive d'une combinaison des anticorps monoclonaux largement neutralisants ante- (administration des anticorps à la femelle gestante) et post-partum (administration des anticorps pré- et post-exposition aux macaques nouveau-nés) conférerait une protection complète des macaques nouveau-nés vis à vis d'une épreuve virulente orale par la souche SHIV-vpu⁺ (virus chimère présentant le gène *env* d'une souche de VIH-1 adapté au laboratoire, IIB) (Baba *et al.*, 2000). L'administration passive post-natale uniquement, pré- et/ou post-exposition, suffirait pour protéger partiellement ou complètement des macaques nouveau-nés d'une épreuve virulente orale par les souches SHIV89.6P (virus chimère présentant le gène *env* d'un virus primaire) et SHIV-vpu⁺ respectivement (Ferrantelli *et al.*, 2007, 2003, 2004; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001a, 2001b, 2002; Ruprecht *et al.*, 2003). Une étude récente a mis en évidence que l'administration passive d'anticorps neutralisants chez des macaques nouveau-nés aboutirait à un contrôle de la virémie suite à une infection par du SHIV. Les macaques infectés développeraient rapidement des anticorps neutralisants et une activité ADCVI entraînant une diminution de la charge virale plasmatique (Ng *et al.*, 2010).

Objectifs du travail

Les objectifs de notre équipe sont de contribuer à l'identification des déterminants moléculaires des protéines d'enveloppe du VIH-1 associés à la neutralisation par des anticorps neutralisants de large spectre, ou associés à l'échappement à la neutralisation. Le contexte de la transmission mère-enfant offre la possibilité d'étudier le rôle des anticorps neutralisants dans la protection vis-à-vis de l'infection. Ceci est d'autant plus vrai lorsque la transmission se fait tardivement (intrapartum), le fœtus ou nouveau-né est alors exposé au virus en présence d'anticorps maternels passifs pré-existants dont certains ont une activité neutralisante de plus ou moins large spectre. La transmission mère-enfant est donc un modèle naturel permettant d'analyser les caractéristiques des virus échappant aux anticorps neutralisants pré-existants au cours d'une situation naturelle qui mime au moins en partie la situation d'un individu exposé au VIH-1 qui aurait été vacciné et aurait développé des anticorps post-vaccinaux.

Dans le cadre d'un projet collaboratif avec le groupe de M Lallemand (IRD URI 174, Chiang Mai, Thaïlande), l'équipe avait montré que la présence ou les titres élevés d'anticorps neutralisant un isolat primaire hétérologue de sous-type CRF01_AE, MBA, étaient associés à un risque plus faible de transmission intrapartum du VIH-1 (Barin *et al.*, 2006). Ces résultats ont été confirmés lors d'une étude complémentaire menée sur une population plus large avec des critères de sélection particulièrement stringents, et semble de plus montrer que l'isolat MBA serait un bon indicateur de la présence d'anticorps neutralisants associés à l'absence de transmission intrapartum chez des patientes infectées par une souche CRF01_AE (Samleerat *et al.*, 2009). En parallèle de ces travaux, une analyse moléculaire des virus transmis de la mère à l'enfant chez 17 paires mère-enfant avait été réalisée. L'une des constatations majeures était que 2 sites potentiels de N-glycosylation (PNGS), N301 localisé à la base de la boucle variable V3 et N384 localisé dans le domaine constant C3, étaient retrouvés systématiquement dans tous les clones des virus de nouveau-nés mais irrégulièrement dans les clones de virus maternels au sein des couples mère-enfant. Ceci suggérerait que ces PNGS pourraient conférer un avantage sélectif aux variants transmis (Samleerat *et al.*, 2008).

Mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à identifier les caractéristiques moléculaires de l'enveloppe de l'isolat MBA pouvant expliquer l'association observée entre titres élevés en anticorps neutralisant MBA et faible taux de transmission intrapartum. Dans un second temps, afin de déterminer le rôle des sites de glycosylation N301 et N384 dans un

possible avantage sélectif conféré aux virus transmis, j'ai entrepris l'analyse des propriétés antigéniques et fonctionnelles de clones d'enveloppe issus de variants de 4 couples mère-enfant provenant de l'étude moléculaire réalisée antérieurement au laboratoire par T Samleerat, selon que ces clones possédaient ou non ces sites de glycosylation (Samleerat *et al.*, 2008). Enfin, je me suis appuyée sur le matériel biologique généré afin de contribuer à la caractérisation des épitopes reconnus par deux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants récemment décrits, PG9 et PG16 (Walker *et al.*, 2009).

L'ensemble des résultats est présenté dans les pages suivantes sous forme d'un résumé pour chacun des travaux réalisés accompagné des manuscrits publiés ou soumis à publication.

Résultats & discussion

I) Caractéristiques moléculaires de la souche MBA liées à la neutralisation

Article 1

Maternal neutralizing antibodies against a CRF01_AE primary isolate are associated with a low rate of intrapartum HIV-1 transmission

Tanawan SAMLEERAT, Suzie THENIN*, Gonzague JOURDAIN, Nicole NGO-GIANG-HUONG, Alain MOREAU, Pranee LEECHANACHAI, Jirapan ITHISUKNANTH, Karin PAGDI, Pornpun WANNARIT, Suraphan SANGSAWANG, Marc LALLEMANT, Francis BARIN, Martine BRAIBANT*

** contribution équivalente des deux auteurs*

Publié en 2009 dans Virology (Samleerat *et al.*, Virology. 387(2) : 388-394)

Les anticorps neutralisants maternels pourraient jouer un rôle dans la prévention de la transmission mère-enfant, notamment lors de la transmission intrapartum au cours de laquelle l'enfant est exposé au virus en présence de forts taux d'anticorps maternels passifs pré-existants. Certaines études ont mis en évidence le rôle des anticorps neutralisants maternels dans la réduction de la transmission mère-enfant en démontrant que la présence ou des titres élevés en anticorps neutralisants étaient plus fréquemment détectés chez des mères qui ne transmettent pas le virus à leur enfant que chez des mères transmetteuses. Cependant, des résultats contradictoires, liés en grande partie à la méthodologie, ont été obtenus (Bongertz *et al.*, 2002; Guevara *et al.*, 2002; Hengel *et al.*, 1998; Lathey *et al.*, 1999; Scarlatti *et al.*, 1993b).

Dans une étude antérieure, nous avons émis l'hypothèse que des anticorps neutralisants hétérologues de large spectre seraient susceptibles de protéger l'enfant de la transmission intrapartum du VIH. Cette étude avait mis en évidence que la présence ou des titres élevés en anticorps neutralisant un isolat primaire hétérologue de sous-type CRF01_AE, MBA, étaient associés à un faible taux de transmission intrapartum du VIH-1 en Thaïlande (Barin *et al.*, 2006). Afin de confirmer l'association observée, nous avons réalisé une étude complémentaire sur une population thaïlandaise plus large avec des critères de sélection particulièrement stringents. Pour cela, nous avons mesuré et comparé les titres en anticorps neutralisants dirigés contre 6 isolats primaires (3 de sous-type B et 3 de sous-type CRF01_AE, C1712, LEA et MBA) chez des mères transmettant ou non le virus à leur enfant. Comme dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence que des titres élevés en anticorps neutralisant MBA étaient associés à un faible taux de transmission intrapartum du VIH-1. Par contre, aucune association n'a été trouvée pour les 5 autres virus. Nous avons également mis en évidence que MBA était plus résistant à la neutralisation que les deux autres virus de sous-type CRF01_AE, LEA et C1712. Nous avons donc recherché si la protéine d'enveloppe de MBA présentait une ou des caractéristiques moléculaires pouvant expliquer l'association observée uniquement avec cet isolat, ainsi que la résistance à la neutralisation de ce virus. Par comparaison des séquences protéiques d'enveloppe des 3 isolats de sous-type CRF01_AE, nous avons mis en évidence que l'enveloppe de MBA possédait une région variable V2 exceptionnellement longue et fortement glycosylée. Des travaux ayant montré que le domaine V1V2 pouvait influencer la sensibilité à la neutralisation en masquant des épitopes neutralisants (Pinter *et al.*, 2004; Rong *et al.*, 2007a; Sagar *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2007; Wolk & Schreiber,

2006), nous avons émis l'hypothèse que cette longue région variable V2 pourrait contribuer à la résistance à la neutralisation du virus MBA. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons construit deux enveloppes chimères en intervertissant les domaines V2 des enveloppes des virus LEA et MBA. La comparaison des profils de neutralisation, par 10 sérums de mères, de virus pseudotypés porteurs des enveloppes parentales LEA et MBA, ou de l'enveloppe chimère composée de la région V2 de MBA dans le squelette d'enveloppe de LEA (V2MBA-*env*ΔV2LEA), nous a permis de mettre en évidence que le domaine V2 de MBA était responsable en partie de la résistance à la neutralisation de ce virus. De plus, nous avons confirmé que l'isolat MBA serait un bon indicateur de la présence d'anticorps neutralisants associés à l'absence de transmission intrapartum chez des patientes infectées par une souche CRF01_AE.

Ces résultats ont conduit à la publication d'un article paru dans *Virology* en 2009 en tant que co-premier auteur. Dans cet article, T Samleerat avait réalisé la partie neutralisation sur virus primaires et j'avais pris en charge l'ensemble des analyses moléculaires ainsi que l'ensemble des travaux de neutralisation de virus pseudotypés.



Maternal neutralizing antibodies against a CRF01_AE primary isolate are associated with a low rate of intrapartum HIV-1 transmission

Tanawan Samleerat^{a,b,1}, Suzie Thenin^{a,1}, Gonzague Jourdain^{c,d}, Nicole Ngo-Giang-Huong^{c,d}, Alain Moreau^a, Pranee Leechanachai^b, Jirapan Ithisuknanth^e, Karin Pagdi^f, Pornpun Wannarit^f, Suraphan Sangsawang^g, Marc Lallemand^{c,d}, Francis Barin^{a,*}, Martine Braibant^a

^a Université François-Rabelais, Inserm U966, Tours, France

^b Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

^c Harvard School of Public Health, Boston, USA

^d Institut de Recherche pour le Développement, URI 174, Chiang Mai, Thailand

^e Banglamung Hospital, Chonburi, Thailand

^f Provincial Hospital, Lamphun, Thailand

^g Health Promotion Center Region 10, Chiang Mai, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2008

Returned to author for revision

9 February 2009

Accepted 18 February 2009

Available online 20 March 2009

Keywords:

HIV

Mother-to-child transmission

Neutralizing antibodies

ABSTRACT

Mother-to-child transmission (MTCT) of HIV-1 provides a model for studying the role of passively acquired antibodies in preventing HIV infection. We determined the titers of neutralizing antibodies (NAbs) against six primary isolates of clades B and CRF01_AE in sera from 45 transmitting and 45 nontransmitting mothers matched for the main independent factors associated with MTCT in Thailand. A lower risk of MTCT, particularly for intrapartum transmission, was associated only with higher NAb titers against the CRF01_AE strain, MBA. The envelope glycoprotein of this strain showed an unusually long V2 domain of 63 amino acids, encoding six potential N-linked glycosylation sites. We provided experimental data indicating that the extended V2 domain contributed to the higher level of resistance to neutralization by mothers' sera in this strain. Taken together the data suggest that some primary isolates with specific properties may be useful indicators for identifying protective antibodies.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Mother-to-child transmission (MTCT) is the leading source of human immunodeficiency virus (HIV) infection in children. In the absence of preventive measures, transmission may occur during pregnancy (*in utero*), labor or delivery (intrapartum) or after birth, through breastfeeding. Previous studies have shown that, despite a heterogeneous viral population in the mother, only homogeneous viral variants were generally transmitted to the infant (Ahmad et al., 1995; Samleerat et al., 2008; Scarlatti et al., 1993; Verhofstede et al., 2003; Wolinsky et al., 1992). Maternal neutralizing antibodies (NAbs) can cross the placental barrier, reaching high levels in the fetus at the end of pregnancy and protecting the infant against infection with numerous pathogens (Englund, Glezen, and Piedra, 1998; Safrit et al., 2004). Maternal antibodies are therefore among the selective host factors that could play a role in limiting transmission of neutralization-sensitive variants. However, conflicting results have been

obtained concerning the role of maternal NAbs in reducing MTCT of HIV (Barin et al., 2006; Bongertz et al., 2001; Hengel et al., 1998; Lathey et al., 1999; Scarlatti et al., 1993). The differences in the results obtained may be due to differences in the methods used or populations studied. Particularly, analyses of the role of passively transferred antibodies should clearly separate cases of intrapartum transmission from *in utero* transmission: only in cases of intrapartum transmission can we be sure that exposure to the virus occurs in the presence of optimal levels of IgGs. Supporting a role of maternal NAbs in limiting MTCT, several recent molecular studies have shown that viruses transmitted are escape variants resistant to autologous maternal plasma (Dickover et al., 2006; Wu et al., 2006).

We previously hypothesized that broadly cross-neutralizing heterologous NAbs would protect babies against intrapartum HIV transmission. We measured NAb titers against primary isolates of various clades in sera from pregnant Thai women, for whom the time of transmission was known (Barin et al., 2006). We identified an association between higher titers of NAbs against a CRF01_AE primary isolate, MBA – belonging to the predominant clade in Thailand – and lower rates of intrapartum transmission. However, only one isolate per clade was used in this previous study. Here, we extended our previous study using several CRF01_AE strains in a different Thai

* Corresponding author. Laboratoire de Virologie, CHU Bretonneau, 2 boulevard Tonnelé, 37044 Tours cedex, France. Fax: +33 2 47473610.

E-mail address: fbarin@med.univ-tours.fr (F. Barin).

¹ The two first authors contributed equally to this work.

population, selected on the basis of highly stringent criteria, and we confirmed the association previously observed. We also identified a specific feature of the envelope glycoprotein in this strain, accounting for this association, at least in part.

Results and discussion

Neutralizing activity of sera from mothers against six primary isolates

Neutralizing activity was tested against six heterologous primary isolates of different phenotypes in sera from 45 transmitting and 45 nontransmitting Thai mothers. Subjects were matched for baseline viral load and duration of zidovudine prophylaxis, the two main independent factors associated with MTCT in Thailand (Table 1A). Three of these primary isolates, MBA, LEA and C1712, belong to the predominant clade in Thailand, CRF01_AE. The other three, BIG, CHA and FRO, belong to the less prevalent clade B. None of the 90 sera displayed no neutralizing activity, whereas 15 sera (17%), including both transmitters and non-transmitters, showed neutralizing activity against all six strains. Although cross-clade NABs were detected in several sera, subtype-specific neutralizing antibodies predominated (Table 1B, Fig. 1A). Among the 80 CRF01_AE-infected mothers, 76 sera (95%) neutralized at least one strain of subtype CRF01_AE, a higher proportion than observed for strains of subtype B (50 of 80, 63%). The opposite was previously observed when we explored serum samples from long-term non-progressors infected by subtype B variants (Braibant et al., 2006). However, the sensitivity to neutralization differed between CRF01_AE strains. The MBA strain was more resistant to neutralization than the other two CRF01_AE strains, LEA and C1712. Only 57 of 90 sera (63%) were able to neutralize MBA, whereas 75 (83%) and 81 (90%) sera neutralized C1712 and LEA, respectively (McNemar's test, $P < 0.001$ and $P = 0.001$, respectively). In contrast, the three subtype B isolates were each neutralized by a similar proportion of sera: BIG was neutralized by 39 (43%), CHA by 35 (39%) and FRO by 38 (42%) (McNemar's test not significant).

Table 1

Baseline characteristics of transmitting and nontransmitting mothers (A) and comparison of detectable neutralizing antibodies against the six primary isolates in transmitting and nontransmitting mothers (B).

A				
Characteristics	Nontransmitters (n = 45)	Transmitters (n = 45)	p value	
	Median (range)	Median (range)	Kruskal–Wallis test	
Age (years)	26 (22–30)	25 (23–30)	0.61	
CD4 cell count (per mm ³)	352 (240–434)	320 (220–450)	0.96	
Viral load (log ₁₀ copies/ml)	4.38 (3.89–4.75)	4.41 (3.87–4.71)	0.97	
Duration of zidovudine prophylaxis (weeks)	6 (4–11)	6 (4–11)	0.92	
Hemoglobin level (g/dl)	10.6 (10.1–11.5)	10.4 (9.8–11.2)	0.23	
Hematocrit (%)	32 (30–35)	32 (30–34)	0.33	
Gestational age at sample acquisition (weeks)	26 (22–26)	26 (21–26)	0.60	
Sample acquisition to delivery (weeks)	14 (13–17)	14 (12–19)	0.98	
B				
Presence of detectable NABs against	Nontransmitters (n = 45)	Transmitters (n = 45)	p value	
	n (%)	n (%)	Fisher's exact test	CLR
BIG (B/R5)	22 (49%)	17 (38%)	0.40	0.30
CHA (B/R5X4)	18 (40%)	17 (38%)	1.00	0.84
FRO (B/X4)	20 (44%)	18 (40%)	0.83	0.67
LEA (CRF01_AE/R5)	41 (91%)	40 (89%)	1.00	0.74
MBA (CRF01_AE/R5X4)	34 (76%)	23 (51%)	0.03	0.02
C1712 (CRF01_AE/X4)	37 (82%)	38 (84%)	1.00	0.78

The percentage of mothers with detectable NABs against the three subtype B isolates and two of the CRF01_AE isolates (LEA and C1712) was similar between transmitting and nontransmitting mothers (Table 1B). In contrast, NABs against MBA — the most resistant CRF01_AE strain to neutralization — were detected in 34 of 45 nontransmitting mothers (76%), a proportion significantly higher than that in transmitting mothers (23 of 45, 51%) (Fisher's exact test: $P = 0.03$; conditional logistic regression, CLR: $P = 0.02$, odds ratio 3.8; 95% confidence interval: 1.2 to 11.3) (Table 1B). This difference remained significant if the analysis was restricted to the 80 CRF01_AE-infected mothers (CLR: $P = 0.01$, odds ratio 6.5; 95% confidence interval: 1.5 to 28.8). Similarly, the distribution of titers against BIG, CHA, FRO, LEA and C1712 did not differ significantly between transmitting and nontransmitting mothers, whereas higher titers against MBA were observed in nontransmitting mothers (Wilcoxon signed rank, $P = 0.01$) (Fig. 1A). High titers of NABs against MBA remained associated with a lower rate of HIV-1 transmission when the analysis was restricted to CRF01_AE-infected mothers (Wilcoxon signed rank, $P = 0.009$).

Neutralizing antibodies against MBA were undetectable in 15 of the 29 mothers who transmitted the virus intrapartum (52%) but in only seven of 29 (24%) matched nontransmitting mothers (Fisher's exact test, $P = 0.06$; CRL, $P = 0.05$), and were undetectable in six (43%) of the 14 mothers who transmitted the virus *in utero* but only two of 14 (14%) matched nontransmitting mothers (Fisher's exact test, $P = 0.21$; CRL, $P = 1$). Levels of neutralizing antibodies against MBA were significantly lower in mothers who transmitted the virus intrapartum than in matched nontransmitting mothers (Wilcoxon signed rank, $P = 0.03$). In contrast, they were not statistically different between mothers who transmitted the virus *in utero* and nontransmitting mothers (Wilcoxon signed rank, $P = 0.15$) (Fig. 1B). These findings confirm the results of a previous study of a random sample of 28 transmitting and 62 nontransmitting mothers (Barin et al., 2006). Of the 45 transmitting and the 45 nontransmitting women who participated in the present study, only 14 (31%) and 3 (7%) were also included in the previous study. This indicates that the population was substantially different from the previous study, and therefore strengthens the finding. Such antibodies may thus be associated with a lower risk of MTCT. As intrapartum exposure to HIV resembles a natural challenge in the presence of preexisting antibodies, it might be possible to identify correlates of protection useful for ongoing or future vaccine studies.

Molecular characteristics of the MBA envelope glycoprotein

The molecular characteristics of the envelope glycoprotein of MBA may at least partially explain the association between a reduced risk of MTCT and the presence of NABs against this isolate. We thus studied the *env* gene in the three CRF01_AE strains. Alignment of the Env amino-acid sequences from the three strains revealed a major difference between MBA and the other two strains (Fig. 2). MBA Env had an unusually long V2 domain of 63 amino acids (23 and 25 amino acids longer than that of LEA and C1712, respectively), encoding six potential N-glycosylation sites (PNGS) versus only two PNGS in LEA and C1712. Searches of homology between MBA Env and sequences found in the HIV sequence database, using the HIV Blast program, revealed that this extended MBA V2 domain is unique. A detailed analysis of the V2 domains of the 68 CRF01_AE strains present in the web-alignment of the full spectrum of HIV sequences (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) from the HIV sequence database, revealed that the longest of these V2 domains was composed of 53 amino acids (accession number U51188) and the V2 domain with the greatest number of potential glycosylation sites encoded five PNGS (accession number AY444805). In addition to this long MBA V2 domain, three PNGS were found in the C2 constant domain, the V4 variable loop and the membrane proximal external

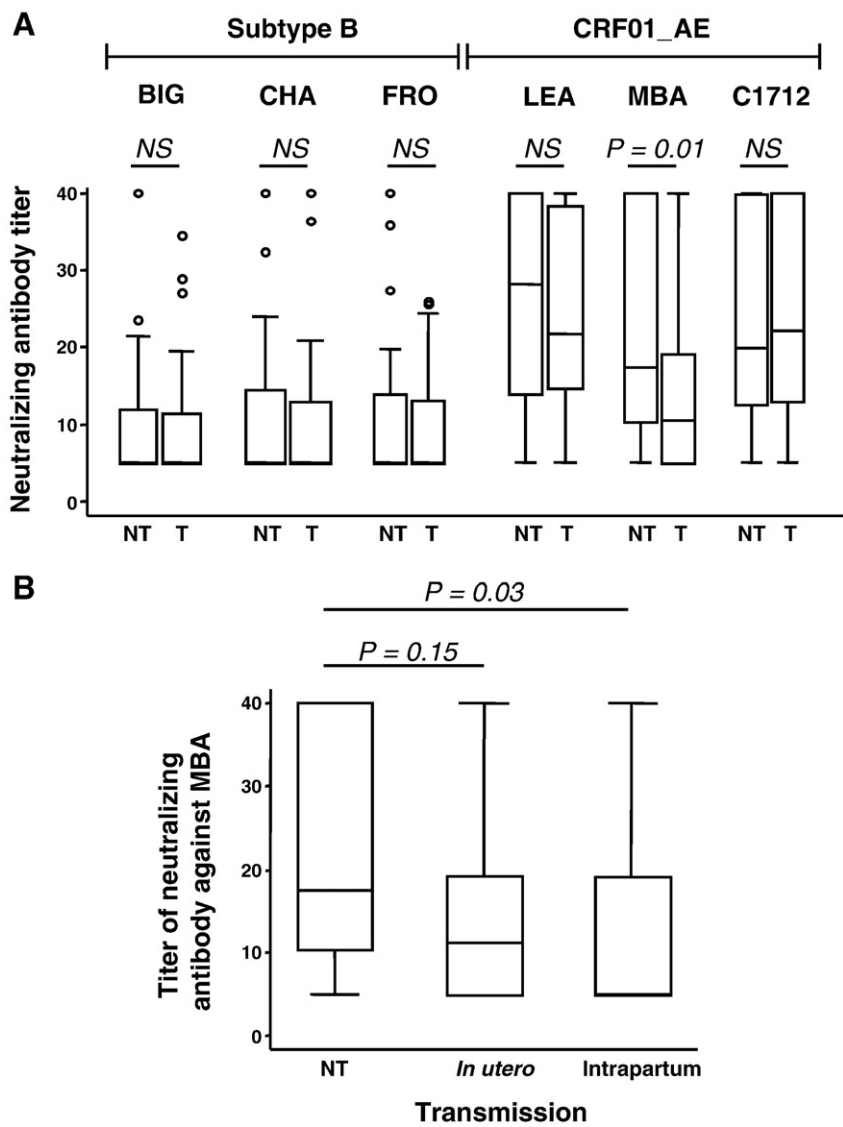


Fig. 1. Comparison of neutralizing antibody titers in transmitting (T) and nontransmitting (NT) mothers. (A) Comparison of NAb titers against the six strains in transmitting and nontransmitting mothers. Box plots show the distribution of maternal antibody titers; for each distribution, the horizontal lines represent the lower adjacent 25th, median, 75th, and upper adjacent percentiles. (B) Comparison of NAb titers against the MBA strain in nontransmitting mothers and transmitting mothers according to time of transmission (*in utero* or intrapartum). Nab titers were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test. NS: not significant.

region (MPER) of the MBA envelope glycoproteins (Fig. 2). We also identified a deletion of seven amino acids in the gp41 cytoplasmic tail in MBA, but not in LEA or C1712. The three PNGS observed in MBA are not specific to this strain. Indeed, two PNGS are present in the C2 and

MPER domains in the envelope protein of the strain HxB2, which is highly sensitive to neutralization. Additionally, the envelope proteins of several other CRF01_AE strains possess the two PNGS in the V4 and MPER domains (data not shown).

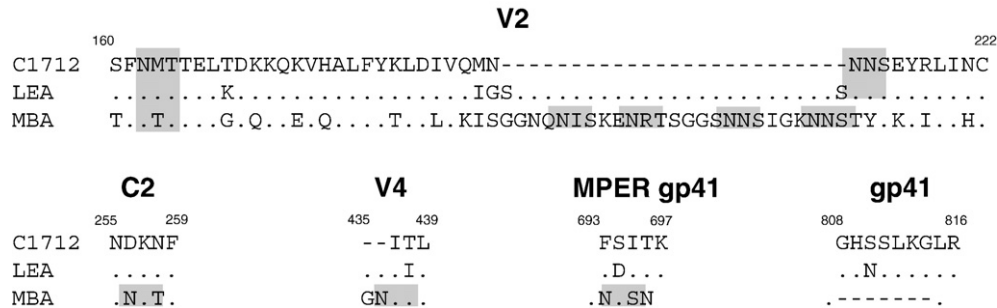


Fig. 2. Sequence characteristics, and their location, in the MBA envelope glycoprotein. The Env amino-acid sequences of C1712, LEA and MBA were aligned using the BioEdit package version 5.0.9. Only regions showing characteristics specific to MBA are indicated. Amino-acid numbering is based on MBA amino-acid Env sequence. Identical amino acids and insertions are indicated by dots or dashes, respectively. PNGS (NXT or NXS) are highlighted in grey.

Several reports having shown that the V1V2 domain strongly influences sensitivity to neutralization by masking neutralizing targets (Pinter et al., 2004; Rong et al., 2007; Sagar et al., 2006; Shibata et al., 2007; Wolk and Schreiber, 2006), we therefore hypothesized that this unusual V2 domain contributes to the greater resistance to neutralization observed for MBA than that observed for LEA or C1712. To test this hypothesis, we produced pseudotyped viruses expressing the MBA and LEA wild-type Env proteins or two chimeric Env proteins, constructed by swapping the V2 domains (V2LEA–EnvΔV2MBA and V2MBA–EnvΔV2LEA). The chimeric V2LEA–EnvΔV2MBA pseudotyped virus, expressing the V2 domain of LEA in an MBA Env backbone, was not infectious. We therefore compared the neutralization profiles of the three other viruses,

expressing MBA, LEA and V2MBA–EnvΔV2LEA, using 10 serum samples from mothers whose sera were more efficient at neutralizing LEA than MBA (Fig. 3). The MBA V2 domain conferred a higher level of resistance to neutralization to LEA in the presence of six of the 10 sera (Fig. 3; Table 2). Indeed, the chimeric virus displayed neutralization profiles for sera WT1064 and WT1382 similar to those of MBA, but with a level of sensitivity to neutralization approximately three times lower than that displayed by LEA. The neutralization profiles of the chimeric virus in the presence of sera WT0744, WT0769, WT0836 and WT1388 were intermediate between those of LEA and MBA, with LEA displaying a level of sensitivity to neutralization that was between 1.5 and 2.2 times higher. In contrast, the presence of the MBA V2 region did not affect the neutralization profile of the

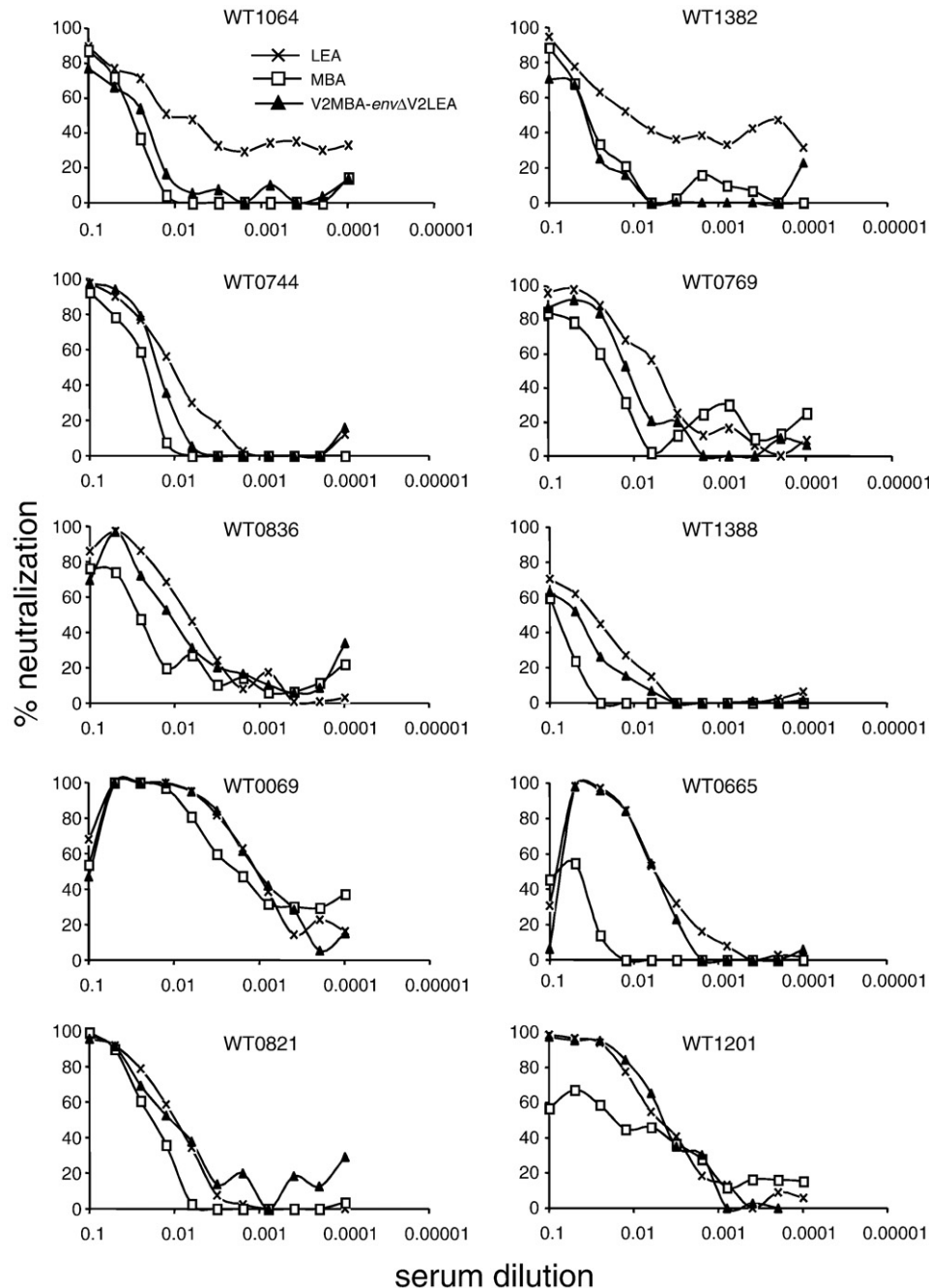


Fig. 3. Effect of the MBA V2 domain on LEA neutralization. Neutralization activity in sera from 10 mothers was determined against viruses pseudotyped with the parental Env proteins from LEA (crosses) and MBA (open squares), and with the chimeric envelope protein V2MBAEnvΔV2LEA (closed triangles). Percentage of neutralization is plotted against serum dilution. The sera used are indicated at the top of each panel.

Table 2

Neutralizing antibody titers in 10 serum samples against LEA, MBA and V2MBA–EnvΔV2LEA pseudotyped viruses.

Serum	LEA	MBA	V2MBA–EnvΔV2LEA
WT1064	100	32.5	44.2
WT1382	95	30.5	28.1
WT0744	98.7	46.8	66.8
WT0769	193.2	54.6	87
WT0836	146.1	38.1	89.8
WT1388	34	12.7	21.6
WT0069	981	572.9	1014.7
WT0665	182.9	22.3	183.2
WT0821	108.7	57.3	93.5
WT1201	217.1	65.1	240.3

chimeric virus in the presence of sera WT0069, WT0665, WT0821 and WT1201. These results indicate that the V2 region of MBA is involved in determining neutralization resistance in this strain, but that other determinants may be involved.

Taken together, our data suggest that the antibodies involved in reducing the risk of MTCT would be potent antibodies targeting either epitopes exposed on the large V2 domain itself or, alternatively, distant epitopes exposed by a particular conformation imposed by this large heavily glycosylated structure. Interestingly, Pinter et al. showed that the V1V2 domain is a global regulator of sensitivity of primary isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection, but not by rare antibodies able to neutralize a broad range of primary isolates, such as the human monoclonal antibodies 2F5, 2G12 or b12 (Pinter et al., 2004). Further characterization of maternal antibodies with potent neutralizing activity against MBA and associated with a lower risk of MTCT, may therefore allow the identification of key epitopes involved in neutralization and protection.

In conclusion, this study confirms that higher titers of maternal antibodies against a CRF01_AE primary isolate, MBA, are associated with a lower intrapartum risk of HIV-1 transmission in Thailand, and that the V2 domain of gp120 seems to have a major role in the neutralization process. Our results suggest that certain primary isolates may be indicative of a protective antibody response. Further studies aiming to select strains indicative of neutralization/protection may facilitate the identification of correlates of protection crucial for the development of protective vaccines. The MTCT model could be beneficial for such studies.

Materials and methods

Study population and samples collection

Samples were obtained from HIV-1-infected pregnant women enrolled in a clinical trial assessing various zidovudine (ZDV) treatment regimens for the prevention of MTCT in Thailand (Perinatal HIV Prevention Trial, PHPT-1), in which infants were not breastfed (Lallemant et al., 2000). The HIV-1 infection status of the infants was determined by HIV-1 proviral DNA PCR as previously described (Barin et al., 2006; Lallemant et al., 2000). We selected 45 transmitting mothers (cases) and 45 nontransmitting mothers (controls) from the original study. Subjects were matched for baseline maternal viral load and duration of maternal zidovudine prophylaxis, the two main independent factors associated with MTCT (Table 1A). Of the 45 transmitting mothers, 14 transmitted HIV-1 to their infants *in utero* and 29 transmitted the virus intrapartum. The timing of transmission was not specified for two of the mothers. Blood samples were collected at baseline, before the start of ZDV prophylaxis, 4 to 11 weeks before delivery. Maternal viruses were subtyped, by both V3 serotyping (Barin et al., 2006) and phylogenetic analysis of genomic sequences (Brand et al., 2004). Samples

with discrepant results in V3 serotyping and genetic analysis were defined as indeterminate. HIV-1 CRF01_AE was identified in 80 (89%) and subtype B, in four (4%) of the 90 mothers. Six samples were indeterminate.

Heterologous primary isolates neutralization assay

The heterologous primary isolates selected for this study belonged to the two prevalent clades in Thailand (CRF01_AE and B) and displayed various phenotypes (X4, R5, dual-tropic). There were three clade B strains, FRO (X4), BIG (R5) and CHA (R5X4), and three CRF01_AE strains, C1712 (X4), LEA (R5) and MBA (R5X4). The titers of NAb against the six primary isolates in each maternal serum sample were determined using the P4P cell assay, as previously described (Barin et al., 2004; Barin et al., 2006; Charneau et al., 1994). The assay was performed in duplicate and results were expressed as mean values. The neutralization titer was defined as the reciprocal of the serum dilution resulting in a 90% decrease in the number of infected cells 2 days after infection with 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose).

Amplification, cloning and sequencing of env genes

Genomic RNA from C1712, LEA and MBA viruses was extracted from each virus stock using the QIAamp® viral RNA Mini Kit (Qiagen). Full-length (gp160) *env* gene was amplified by nested RT-PCR using subtype CRF01_AE *env*-specific primers. The outer primer pair was sensAEext (5'-GGTTARTTVARAGAATAAGAGAAAGAG-3') and asAEext (5'-TRCTTTTGGACCAATGTCYCCCAT-3'), and the inner primers pair was sensAEint (5'-AGAAGACAGTGGAAATGAGAGTGA-3') and asAEint (5'-ATDTTATRSAAAGHCCTTTCDAAGCC-3'). Reverse transcription (RT) was carried out for 30 min at 50 °C. This was followed by the first round of PCR, using the SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates kit (Invitrogen) with the following conditions: 2 min at 94 °C, then 35 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 50 °C and 3 min at 68 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C. MBA *env* gene amplification differed from that of the two other viruses by the number of cycles (40 cycles) and annealing temperature (45 °C). A 5 µl aliquot of the products from the first round of PCR was then used as template for the second round of amplification under the same cycling conditions, with Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen). PCR products were cloned into pCR2.1 (TOPO TA cloning® Kit; Invitrogen), before being excised by EcoRI restriction and transferred into the EcoRI site of the pCI expression vector (Invitrogen). PCR products and pCR2.1-*env* clones were sequenced, using a set of *env*-specific internal primers, according to the Dye Terminator cycle sequencing protocol (Applied Biosystems). Potential N-linked glycosylation sites (PNGS) were identified by N-GlycoSite (Zhang et al., 2004). MBA, C1712 and LEA *env* sequences have been submitted to GenBank and assigned accession numbers DQ518410, DQ518411 and DQ218412, respectively.

Construction of chimeric env genes

Two chimeric *env* genes, V2LEA–*env*ΔV2MBA and V2MBA–*env*ΔV2LEA, were constructed in the pCR2.1 vector. V2 domains of LEA and MBA *env* genes were inverted using a domain exchange strategy, as previously described (Rong et al., 2007). The donor V2 domains of LEA and MBA were amplified by PCR using specific primers annealing at both ends of the V2 domains (Fig. 4A). The primer pairs used for the amplification of the V2 domains were: LEAV2S (5'-TCTTTTAATATGACCACAGAACTAAAAGATAAG-3') and LEAV2AS (5'-ACAATTATTAACCTATACTACTATTACTACTCTC-3') for LEA, and MBV2S (5'-ACTTTTAATACGACACAGACTAGGAGAT-3') and MBV2AS (5'-ACAATGTATTAATATATACTACTATAGGTACTATTG-TTTTCC-3') for MBA. The recipient *env* backbones (deleted of

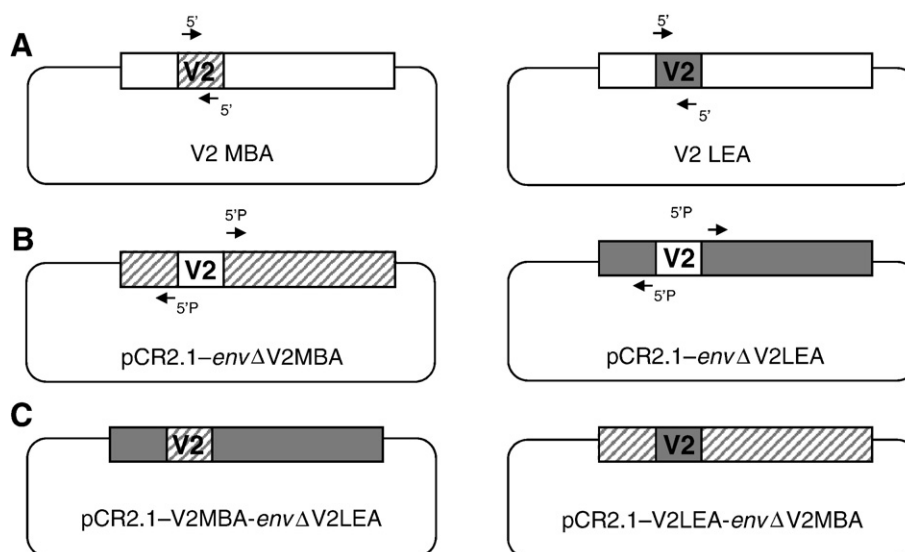


Fig. 4. Construction of the V2 chimeric Envs. (A) *Env* sequences encoding donor V2 domains (MBA and LEA) were amplified by PCR using specific primers that anneal at both ends of the V2 domain. (B) *Env* sequences encoding recipient env backbones within the pCR2.1 vector (pCR2.1-*env*ΔV2MBA and pCR2.1-*env*ΔV2LEA) were amplified by PCR using specific primers that anneal to regions adjacent to the V2 primers. A 5' phosphate group was added to these primers for ligation to the V2 amplicon. (C) Sequences encoding the V2 domains and recipient backbones were blunt-end ligated to generate chimeric *env* genes in pCR2.1 (pCR2.1-V2MBA-*env*ΔV2LEA and pCR2.1-V2LEA-*env*ΔV2MBA).

the V2 domain) within the pCR2.1 vector were amplified by PCR using specific primers that anneal to regions adjacent to the V2 primers (Fig. 4B). A 5' phosphate group (Phos) was added to these primers to allow ligation to the V2 amplicon. The primer pairs used for the amplification of the *env* backbones were: LEAEnvS (5'-Phos-AATCTTCAGTCATTAAGCAGGCTTGTC-3') and LEAEnvAS (5'-Phos-ACAGTTTCTTACTTCATCTGTTATATTTCTATT-3') for LEA, and MBAEnvS (5'-Phos-AATCTTCAGTCATTAAGCAAGCATGTCC-3') and MBAEnvAS (5'-Phos-GCAGTTTCTTACTGATTTTCCATTTTATTGTCT-TAC-3') for MBA.

The PCR amplification conditions for the V2 domains were 30 s at 98 °C, followed by 35 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 57 °C and 30 s at 72 °C, and a final extension step of 72 °C for 10 min. The same amplification conditions were used for *env* backbones, with an extension time at 72 °C increased to 4 min. PHUSION High Fidelity DNA Polymerase (BioLabs) was used to generate blunt-ended PCR amplicons. PCR amplicons were digested with DpnI to remove contaminating template DNA prior to ligation. Each donor V2 DNA fragment was ligated to its recipient *env* backbone to produce two pCR2.1 constructs containing chimeric *env* genes (Fig. 4C). Chimeric *env* genes were then extracted from pCR2.1 by EcoRI digestion and transferred into the EcoRI site of the pCI expression vector (Invitrogen).

Env-pseudotyped virus neutralization assay

Env-pseudotyped viruses were generated by co-transfecting 3×10^6 293T cells with 12 μg of each pCI-*env* plasmid and 8 μg of pNL4.3.LUC.R⁻E⁻ (Connor et al., 1995), using calcium phosphate (Invitrogen). After titration, pseudotyped virus stocks were diluted to obtain 600 TCID₅₀/ml in growth medium. A volume of 25 μl corresponding to 15 TCID₅₀ was then incubated for 1 h at 37 °C with 75 μl of two-fold serial dilutions of heat-inactivated serum. The virus/serum mixture was then used to infect 10,000 TZM-bl cells (Platt et al., 1998; Wei et al., 2002) in the presence of 30 μg/ml DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48 h, using the Bright-Glo luciferase assay (Promega) and a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies) to measure luciferase activity in cell lysates. The assay was performed in duplicate and results were expressed as mean values. Neutralizing antibody titers were defined as the

reciprocal of the serum dilution required to reduce relative luminescence units (RLU) by 50%.

Statistical analysis

Categorical variables were compared using Fisher's exact test and a conditional logistic regression (CLR) model to take into account the matching of the two groups on maternal baseline viral load and ZDV prophylaxis treatment duration (Barin et al., 2006). Continuous variables were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test. We used McNemar's chi-squared test for matched case-control data to compare the proportions of patient sera able to neutralize each strain.

Acknowledgments

We thank Dr E. Menu for providing us with the primary isolates LEA and C1712. pNL4.3.LUC.R⁻E⁻ was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4.3.LUC.R⁻E⁻ from Dr. Nathaniel Landau. The TZM-bl cells were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: TZM-bl from Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun WU and Tranzyme Inc.

This work was supported by funds from the Agence Nationale de Recherches sur le Sida (ANRS, Paris, France), Sidaction (Paris, France), the Institut de Recherche pour le Développement (IRD, Paris, France), and National Institutes of Health (5 R01 HD 33326). T. Samleerat was supported by a doctoral fellowship from the French Ministry of Foreign Affairs. Suzie Thenin was supported by a doctoral fellowship from the ANRS.

References

- Ahmad, N., Baroudy, B.M., Baker, R.C., Chappey, C., 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope V3 region isolates from mothers and infants after perinatal transmission. *J. Virol.* 69 (2), 1001–1012.
- Barin, F., Brunet, S., Brand, D., Moog, C., Peyre, R., Damond, F., Charneau, P., Barre-Sinoussi, F., 2004. Interclade neutralization and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 identified by an assay using HeLa cells expressing both CD4 receptor and CXCR4/CCR5 coreceptors. *J. Infect. Dis.* 189 (2), 322–327.
- Barin, F., Jourdain, G., Brunet, S., Ngo-Giang-Huong, N., Weerawatgoompa, S., Karnchanamayul, W., Ariyadej, S., Hansudewechakul, R., Achalapong, J.,

- Yuthavisuthi, P., Ngampiyaskul, C., Bhakeecheep, S., Hemwutthiphan, C., Lallemand, M., 2006. Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 193 (11), 1504–1511.
- Bongertz, V., Costa, C.I., Veloso, V.G., Grinsztejn, B., Joao Filho, E.C., Calvet, G., Pilotto, J.H., Guimaraes, M.L., Morgado, M.G., 2001. Vertical HIV-1 transmission: importance of neutralizing antibody titer and specificity. *Scand. J. Immunol.* 53 (3), 302–309.
- Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H., Autran, B., Barin, F., 2006. Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS* 20 (15), 1923–1930.
- Brand, D., Bebydefaux, A., Mace, M., Brunet, S., Moreau, A., Godet, C., Jais, X., Cazein, F., Semaille, C., Barin, F., 2004. First identification of HIV-1 groups M and O dual infections in Europe. *Aids* 18 (18), 2425–2428.
- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., Clavel, F., 1994. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J. Mol. Biol.* 241 (5), 651–662.
- Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., Landau, N.R., 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206 (2), 935–944.
- Dickover, R., Garratty, E., Yusim, K., Miller, C., Korber, B., Bryson, Y., 2006. Role of maternal autologous neutralizing antibody in selective perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 escape variants. *J. Virol.* 80 (13), 6525–6533.
- Englund, J., Glezen, W.P., Piedra, P.A., 1998. Maternal immunization against viral disease. *Vaccine* 16 (14–15), 1456–1463.
- Hengel, R.L., Kennedy, M.S., Steketee, R.W., Thea, D.M., Abrams, E.J., Lambert, G., McDougal, J.S., 1998. Neutralizing antibody and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 14 (6), 475–481.
- Lallemand, M., Jourdain, G., Le Coeur, S., Kim, S., Koetsawang, S., Comeau, A.M., Phoolcharoen, W., Essex, M., McIntosh, K., Vithayasai, V., 2000. A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N. Engl. J. Med.* 343 (14), 982–991.
- Lathey, J.L., Tsou, J., Brinker, K., Hsia, K., Meyer 3rd, W.A., Spector, S.A., 1999. Lack of autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and macrophage tropism are associated with mother-to-infant transmission. *J. Infect. Dis.* 180 (2), 344–350.
- Pinter, A., Honnen, W.J., He, Y., Gorny, M.K., Zolla-Pazner, S., Kayman, S.C., 2004. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J. Virol.* 78 (10), 5205–5215.
- Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B., Kabat, D., 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72 (4), 2855–2864.
- Rong, R., Bibollet-Ruche, F., Mulenga, J., Allen, S., Blackwell, J.L., Derdeyn, C.A., 2007. Role of V1V2 and other human immunodeficiency virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. *J. Virol.* 81 (3), 1350–1359.
- Safrit, J.T., Ruprecht, R., Ferrantelli, F., Xu, W., Kitabwalla, M., Van Rompay, K., Marthas, M., Haigwood, N., Mascola, J.R., Luzuriaga, K., Jones, S.A., Mathieson, B.J., Newell, M.L., 2004. Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 35 (2), 169–177.
- Sagar, M., Wu, X., Lee, S., Overbaugh, J., 2006. Human immunodeficiency virus type 1 V1–V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* 80 (19), 9586–9598.
- Samleerat, T., Braibant, M., Jourdain, G., Moreau, A., Ngo-Giang-Huong, N., Leechana-chai, P., Hemvuttiphan, J., Hinjiranandana, T., Changchit, T., Warachit, B., Suraseranivong, V., Lallemand, M., Barin, F., 2008. Characteristics of HIV type 1 (HIV-1) glycoprotein 120 env sequences in mother–infant pairs infected with HIV-1 subtype CRF01_AE. *J. Infect. Dis.* 198 (6), 868–876.
- Scarlatti, G., Albert, J., Rossi, P., Hodara, V., Biraghi, P., Muggiasca, L., Fenyo, E.M., 1993. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. *J. Infect. Dis.* 168 (1), 207–210.
- Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Koito, A., Murakami, T., Matsushita, S., 2007. Impact of V2 mutations on escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J. Virol.* 81 (8), 3757–3768.
- Verhofstede, C., Demecheleer, E., De Cabooter, N., Gaillard, P., Mwanyumba, F., Claeys, P., Chohan, V., Mandaliya, K., Temmerman, M., Plum, J., 2003. Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env sequence after vertical transmission in mother–child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J. Virol.* 77 (5), 3050–3057.
- Wei, X., Decker, J.M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R.B., Kilby, J.M., Saag, M.S., Wu, X., Shaw, G. M., Kappes, J.C., 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (6), 1896–1905.
- Wolinsky, S.M., Wike, C.M., Korber, B.T., Hutto, C., Parks, W.P., Rosenblum, L.L., Kunstman, K.J., Furtado, M.R., Munoz, J.L., 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255 (5048), 1134–1137.
- Wolk, T., Schreiber, M., 2006. N-glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization. *Med. Microbiol. Immunol.* 195 (3), 165–172.
- Wu, X., Parast, A.B., Richardson, B.A., Nduati, R., John-Stewart, G., Mbori-Ngacha, D., Rainwater, S.M., Overbaugh, J., 2006. Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant. *J. Virol.* 80 (2), 835–844.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., Korber, B., 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 14 (12), 1229–1246.

II) Propriétés antigéniques et fonctionnelles des virus transmis de la mère à l'enfant

Article 2

Envelope glycoproteins of Human Immunodeficiency Virus type 1 variants issued from mother-infant pairs display a wide spectrum of biological properties

Suzie THENIN, Tanawan SAMLEERAT, Elsa TAVERNIER, Nicole NGO-GIANG-HUONG, Gonzague JOURDAIN, Marc LALLEMANT, Francis BARIN, Martine BRAIBANT

Publié en 2012 dans Virology (Thenin *et al.*, Virology. 426 (1) : 12-21)

Un certain nombre d'études ont montré que la population virale de l'enfant est restreinte et homogène génétiquement par rapport à la population virale maternelle, suggérant la présence d'une pression de sélection qui aboutit à la transmission d'un nombre limité de variants maternels (Ahmad *et al.*, 1995; Dickover *et al.*, 2001; Kishko *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011; Samleerat *et al.*, 2008; Scarlatti *et al.*, 1993a; Verhofstede *et al.*, 2003; Wolinsky *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2010a). Toutefois, très peu d'études se sont penchées sur les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des virus transmis de la mère à l'enfant.

Dans une étude antérieure réalisée au laboratoire, les séquences de 353 gènes *env* (région V1-V5 de la gp120) de virus de sous-type CRF01_AE infectant 17 couples mère-enfant avaient été obtenues et analysées (Samleerat *et al.*, 2008). L'une des constatations majeures était que deux PNGS, N301 localisé à la base de la boucle variable V3, et N384 localisé dans le domaine constant C3, étaient retrouvés systématiquement dans tous les clones des virus de nouveau-nés mais irrégulièrement dans les clones de virus maternels au sein de couples mère-enfant. Ceci suggérait que ces PNGS pourraient conférer un avantage sélectif aux virus transmis (Samleerat *et al.*, 2008). Nous avons donc exploré les propriétés biologiques de 17 virus pseudotypés porteurs d'enveloppes de clones maternels et de clones transmis à l'enfant issus de 4 couples mère-enfant provenant de l'étude moléculaire réalisée antérieurement, selon que ces variants possédaient ou non les 2 PNGS. Pour cela nous avons comparé les propriétés antigéniques (sensibilité à la neutralisation autologue, hétérologue et vis-à-vis de trois anticorps monoclonaux largement neutralisants b12, PG9 et PG16) et fonctionnelles (sensibilité à deux inhibiteurs d'entrée, le CD4 soluble et un antagoniste du CCR5, infectivité virale et clivage et incorporation des glycoprotéines d'enveloppe) des virus maternels et des virus transmis à l'enfant. Aucune différence significative n'a été observée dans la sensibilité à la neutralisation autologue et hétérologue entre les clones d'enfants et de mères. Nous avons cependant constaté que les clones viraux d'enfants étaient significativement plus sensibles aux anticorps monoclonaux PG9 et PG16 comparé aux clones maternels. De plus, malgré une forte hétérogénéité dans la sensibilité au CD4 soluble, l'infectivité virale, et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppes, aucune différence n'a été observée entre les clones issus des enfants et les clones issus des mères.

De façon surprenante, les résultats obtenus ont mis en évidence que les virus transmis à l'enfant ainsi que les variants présents chez leurs mères chroniquement infectées présentaient une très grande hétérogénéité des propriétés biologiques, et ce malgré la présence d'une population virale génétiquement homogène chez l'enfant. Cependant, nous avons montré que les variants maternels étaient moins sensibles à la neutralisation par PG9 et PG16 que les virus transmis à l'enfant, suggérant que des variants sensibles à PG9 et PG16 présenteraient des propriétés fonctionnelles conférant un avantage sélectif lors de la transmission mère-enfant. Enfin, nous avons confirmé que les sites de N-glycosylation N301 et N384 sembleraient jouer un rôle dans la résistance à la neutralisation autologue bien que non-associés à l'infectivité et à la sensibilité au CD4 soluble.



Envelope glycoproteins of Human Immunodeficiency Virus type 1 variants issued from mother–infant pairs display a wide spectrum of biological properties

Suzie Thenin^a, Tanawan Samleerat^b, Elsa Tavernier^c, Nicole Ngo-Giang-Huong^d, Gonzague Jourdain^d, Marc Lallemand^d, Francis Barin^a, Martine Braibant^{a,*}

^a Université François Rabelais, Inserm U966, Tours, France

^b Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

^c Inserm CIC 202, Tours, France; CHRU de Tours, France

^d Institut de Recherche pour le Développement (IRD), U174, Chiang Mai, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 November 2011

Returned to author for revision

16 January 2012

Accepted 18 January 2012

Available online 4 February 2012

Keywords:

HIV-1

Mother-to-child transmission

Env-pseudotyped viruses

Biological properties

Neutralization

CRF01_AE clade

ABSTRACT

Several studies have shown that the early virus population present in HIV-1 infected infants usually is homogeneous when compared to the highly diversified viral population present at delivery in their mothers. We explored the antigenic and functional properties of pseudotyped viruses expressing gp120 encoded by *env* clones issued from four mother–infant pairs infected by CRF01_AE viruses. We compared their sensitivity to neutralization and to entry inhibitors, their infectivity levels and the Env processing and incorporation levels. We found that both transmitted viruses present in infants and the variants present in their chronically infected mothers display a wide spectrum of biological properties that could not distinguish between them. In contrast, we found that all the transmitted viruses in the infants were more sensitive to neutralization by PG9 and PG16 than the maternal variants, an observation that may have implications for the development of prophylactic strategies to prevent mother-to-child transmission.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Mother-to-child transmission (MTCT) is the leading source of human immunodeficiency virus (HIV) infection in children. In the absence of anti-retroviral prophylaxis, transmission can occur during pregnancy (*in utero*), during labor and delivery (intrapartum), or postnatally through breastfeeding (Scarlati, 2004). Although infants have been found occasionally to be infected by a heterogeneous population of multiple maternal viral variants, molecular studies of MTCT have shown that, despite a heterogeneous viral population in the mother, homogeneous viral variants are generally transmitted to the infant, suggesting the selection of a limited number of maternal viral variants for establishment of a new infection in the infant (Ahmad et al., 1995; Dickover et al., 2001; Kishko et al., 2011; Lamers et al., 1994; Pasquier et al., 1998; Russell et al., 2011; Samleerat et al., 2008; Scarlati et al., 1993b; Verhofstede et al., 2003; Wolinsky et al., 1992; Zhang et al., 2010b).

Maternal neutralizing antibodies (Nabs) are among the selective factors that are potentially responsible for this genetic bottleneck. Maternal antibodies of the IgG class cross the placenta into the fetal bloodstream, reaching high levels in the fetus at the end of pregnancy and protecting the infant against infection by numerous pathogens (Englund et al., 1998; Safrit et al., 2004). Therefore, MTCT of HIV-1 provides a model for studying the role of passively acquired antibodies present in the infant prior to virus exposure. However, reported studies have yielded conflicting results. Some studies have suggested a role of maternal Nabs in reducing MTCT, showing that non-transmitting mothers had more frequently detected or higher Nab responses than mothers who transmitted the virus to their infant (Barin et al., 2006; Bongertz et al., 2002; Lathey et al., 1999; Samleerat et al., 2009; Scarlati et al., 1993a), or that viruses transmitted to infants are escape variants resistant to autologous maternal serum (Dickover et al., 2006; Wu et al., 2006; Zhang et al., 2010a). In contrast, others did not observe any difference neither in breadth or potency of neutralizing antibodies between sera from transmitting and non-transmitting mothers (Guevara et al., 2002; Hengel et al., 1998; Husson et al., 1995; Russell et al., 2011), nor in the sensitivity to neutralization between transmitted infant variants and maternal variants (Kishko et al., 2011; Russell et al., 2011). In addition, a recent study exploring the role of passively acquired HIV antibodies in exposed infants during

* Corresponding author at: Inserm U966, UFR Médecine, 10 blvd Tonnellé, 37032 Tours cedex, France. Fax: +33 2 47 36 61 26.

E-mail addresses: suzie.thenin@etu.univ-tours.fr (S. Thenin), fbarin@med.univ-tours.fr (F. Barin), braibant@med.univ-tours.fr (M. Braibant).

breastfeeding suggested that the breadth and potency of the heterologous antibody response does not predict protection (Lynch et al., 2011).

Very few studies have been done focusing on the viral characteristics associated with MTCT, others than neutralization sensitivity. A correlation between HIV-1 transmission to infants and replicative fitness of transmitted viruses was suggested (Kong et al., 2008) but not confirmed (Kishko et al., 2011). Independently, several studies performed mainly on HIV-1 strains of subtypes A and C suggested that variants with shorter variable loops lengths and fewer potential N-linked glycosylation sites (PNGS) encoded by their *env* gene were selected during MTCT (Russell et al., 2011; Wu et al., 2006; Zhang et al., 2010b). In contrast, we and others did not observe these characteristics among *env* genes from mother–infant pairs infected with variants of B and CRF01_AE clades (Kishko et al., 2011; Samleerat et al., 2008). These discordant results may suggest that, similarly to what was observed during horizontal transmission, molecular properties linked to transmissibility could be subtype-specific (Chohan et al., 2005; Derdeyn et al., 2004; Frost et al., 2005). Nevertheless, in our study performed on CRF01-AE *env* variants of mother–infant pairs, we found that two PNGS, N301 in V3 and N384 in C3, were conserved in almost all infants' variants but were not uniformly present in variants from mothers. We hypothesized that these two PNGS may confer a selective advantage for transmission of the virus to the infants (Samleerat et al., 2008).

In the present study, we compared the biological properties of the virus conferred by the envelope of maternal and infant viral variants issued from four mother–infant pairs infected by HIV-1 of the CRF01_AE clade, in order to explore their association with the restrictive transmission of the virus. A better understanding of antigenic and functional properties of transmitted viral variants may help to the development of vaccines or improved prophylactic strategies to prevent MTCT.

Results

HIV-1 mother–infant pairs (MIPs)

We selected HIV-1 CRF01_AE *env* sequences (V1 to V5 region of gp120) from four previously described MIPs [0377, 0858, 0978 and 1021; (Samleerat et al., 2008)]. Maternal *env* sequences were obtained from peripheral blood samples collected at delivery and infant *env* sequences from plasma samples obtained at the first time point at which the HIV-1 DNA PCR results was positive. One infant (0858) was positive at birth for HIV-1 DNA, indicating that he was infected *in utero* (Table 1). The three remaining infants (0377, 0978 and 1021) were HIV-1 DNA negative at birth but were found positive at 71, 55 and 67 days after birth, respectively. Because of these 3 infants were not breastfed, HIV-1 transmission occurred during delivery (intrapartum). Thirty-seven clones (9 from MIP 0377, 11 from MIP 0858, 12 from MIP 0978 and 5 from MIP 1021) were selected based on the fact that they were representative of the diversity of the variants

present in the mothers and their babies, and that they possessed or not the PNGS at positions N301 and N384 (Fig. 1). Chimeric *env* genes were constructed by insertion of the V1 to V5 *env* fragment in a NL4.3 *env* backbone as previously described (Braibant et al., 2010), and the 37 corresponding Env-pseudotyped viruses were generated. Seventeen of them were infectious in TZM-bl cells: 6 from MIP 0377, 2 from MIP 0858, 6 from MIP 0978 and 3 from MIP 1021 (Table 2, Fig. 1).

Sensitivity to neutralization by maternal plasma

We determined the sensitivity to neutralization of mother- and infant-derived Env-pseudotyped viruses with the maternal plasma collected during pregnancy just before the initiation of zidovudine (ZDV) prophylaxis, 4 to 11 weeks before delivery. Maternal variants issued from MIPs 0377, 0978 and 1021 were relatively resistant to autologous neutralization. Indeed, 0377 maternal clones presented a low sensitivity to neutralization (IC₅₀ range: <20–103.1) and 0978 and 1021 maternal clones were particularly resistant to autologous antibodies, failing to reach 50% neutralization even using a 1:20 dilution of plasma, the highest plasma concentration tested (Table 2). Infant variants were also generally resistant to maternal plasma (IC₅₀ range: <20–28.7), except a single clone from pair 0978, clone 0978-I2, which on contrary, displayed a high sensitivity to maternal plasma (IC₅₀: 883; Table 2). In contrast, the two maternal clones from MIP 0858, presented a high neutralization-sensitivity to maternal autologous plasma with IC₅₀ values of 1197 and 1642. However, due to the lack of infectious infant clones for this pair, we were not able to compare their susceptibility to the transmitted variant(s). When the four pairs were considered together, we did not observe any difference in sensitivity to autologous plasmas between mother and infant variants ($P=0.38$, mixed model test; Fig. 2A).

Sensitivity to neutralization by heterologous sera

We investigated the sensitivity of maternal and infant variants to neutralization by a pool of ten heterologous broadly neutralizing sera selected from patients infected by CRF01_AE viruses in a previous study (Samleerat et al., 2009). The seventeen clones presented a broad and continuous range of sensitivity to heterologous antibodies (IC₅₀ range: 123–5543; Table 2). Among MIP 0377, the infant clone presented a higher neutralization-sensitivity (IC₅₀: 1056) compared to the corresponding maternal clones (IC₅₀ range: 123–339). On the contrary, maternal clones from pairs 0978 and 1021 presented similar sensitivity to heterologous neutralization (0978 IC₅₀ range: 626–5543, 1021 IC₅₀: 990) compared to infants clones (0978 IC₅₀ range: 2277–4150; 1021 IC₅₀: 585 and 746). When the four pairs were considered together, we did not observe any difference in sensitivity to heterologous plasmas between mother and infant variants ($P=0.97$, mixed model test; Fig. 2B).

Sensitivity to neutralization by monoclonal antibodies

We tested the sensitivity of our pseudotyped viruses to neutralization by the broadly neutralizing human monoclonal antibodies (mAbs) b12, PG9 and PG16. b12 is directed against an epitope overlapping the CD4-binding site (CD4BS) (Burton et al., 1994; Saphire et al., 2001), whereas PG9 and PG16 recognize a quaternary neutralizing epitope formed from conserved regions of V1/V2 and V3 variable loops (Pancera et al., 2010; Walker et al., 2009). All maternal and infant clones from MIPs 0377, 0978 and 1021, displayed a high level of resistance to neutralization by mAb b12 (IC₅₀>50 µg/mL), whereas the two maternal clones from pair 0858 were highly sensitive to b12 (IC₅₀<0.1 µg/mL; Table 2). On the contrary, we observed more heterogeneous results for PG9 and PG16 neutralization. Maternal clones issued from MIPs 0377, 0978 and 1021 displayed a broad and continuous range of sensitivity to both PG9 (IC₅₀ range: 0.07 to

Table 1
Characteristics of mother–infant pairs.

MIP	Subject	First positive	Transmission	Number clones selected	Number clones infectious
0377	Mother	–		8	5
	Infant	71 days	ip	1	1
0978	Mother	–		7	3
	Infant	55 days	ip	5	3
1021	Mother	–		2	1
	Infant	67 days	ip	3	2
0858	Mother	–		6	2
	Infant	at birth	iu	5	0

ip: intrapartum.

iu: *in utero*.

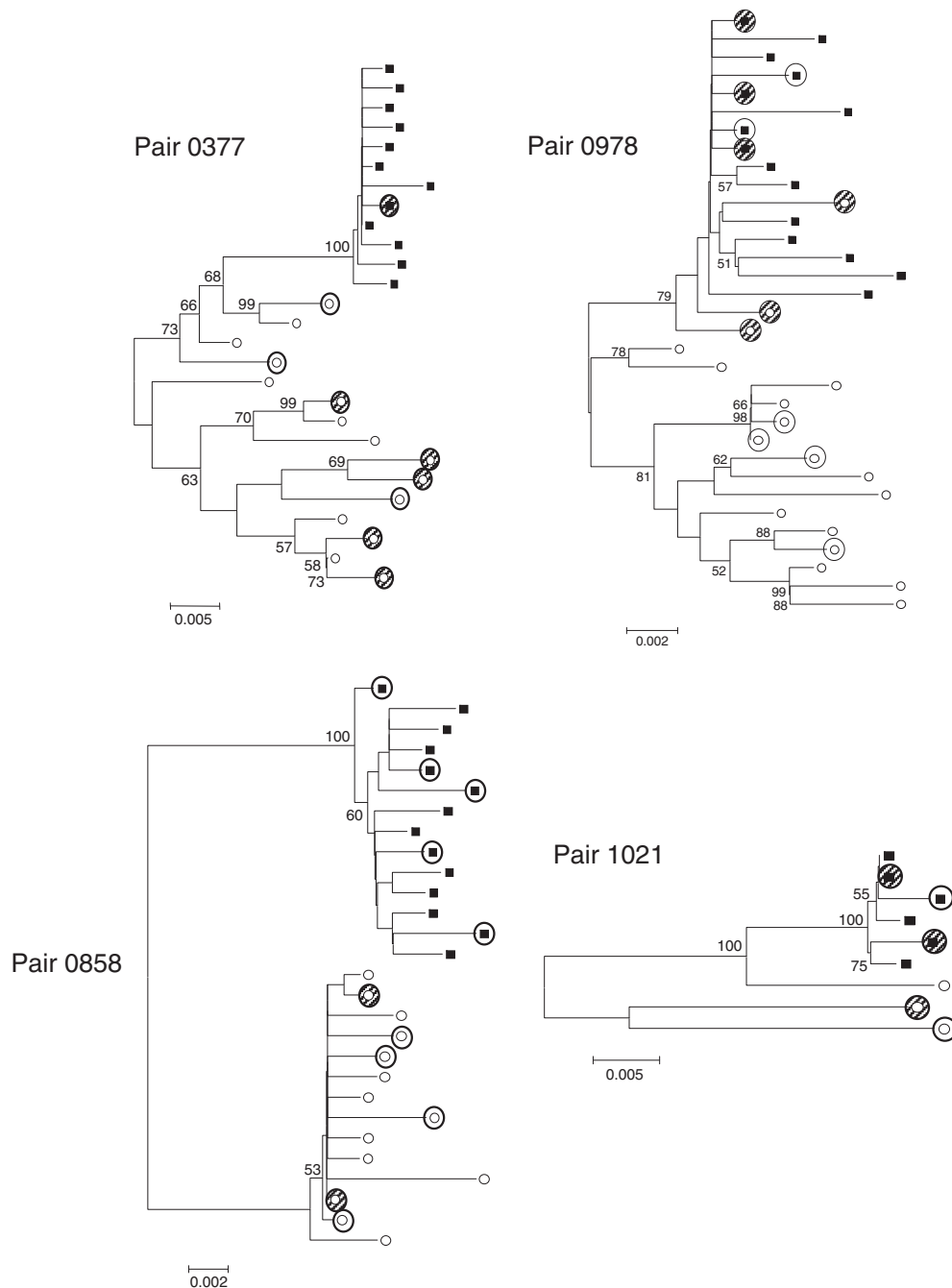


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *env* sequences derived from mother–infant pairs 0377, 0858, 0978 and 1021. A distance scale is given for each neighbor-joining tree. Bootstrap values are expressed as percentages per 1000 replicates, and values above 50% are indicated on nodes. Each symbol denotes a single *env* sequence: ○, maternal sequence; ■, infant sequence. The 37 clones selected for generating Env-pseudotyped viruses are encircled. Among these, the 17 infectious clones are hatched.

>10 µg/mL) and PG16 (IC_{50} range: 0.03 to >10 µg/mL) whereas all infant clones were highly sensitive to both mAbs (PG9 IC_{50} range: 0.03–0.18 µg/mL; PG16 IC_{50} range: 0.01–0.36 µg/mL). When the four MIPs were considered in aggregate, infant clones were significantly more sensitive to PG9 ($P=0.04$, mixed model test; Fig. 2C) and PG16 ($P<0.01$, mixed model test; Fig. 2D) compared to maternal clones.

Viral infectivity in TZM-bl cells and PBMC

A selective advantage for the variants transmitted to the infants could be the consequence of a higher viral infectivity. Therefore, we

investigated the capacity of pseudotyped viruses to infect TZM-bl indicator cells and primary stimulated-peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in a single round of infection. Infectivity level of each pseudotyped virus, whose quantity was normalized for p24 amount, was compared with that of a pseudotyped virus expressing the envelope of the NL4-3 reference strain (Table 2). Although infectivity levels were globally higher in TZM-bl cells than in PBMCs, a high correlation was observed between the two cell types ($r=0.93$; $P<0.0001$; Fig. 3C). A considerable variability in infectivity levels was observed among maternal clones from MIP 0377 with two clones, 0377-M2/M5, being poorly infectious and three clones, 0377-M1/M3/M4, being highly infectious (Table 2). Similarly, a high

Table 2

Summary of the biological properties of mother- and infant-derived Env-pseudotyped viruses.

MIP	env clone (Genbank ID)	N301	N384	Sensitivity to neutralization by					Functional properties				
				Autologous plasma	Heterologous plasma	b12 (μg/ml)	PG9 (μg/ml)	PG16 (μg/ml)	Tropism	sCD4 (μg/ml)	TAK-779 (μg/ml)	TZM-bl infectivity	PBMC infectivity
377	0377-M1 (EU031223)	–	+	103.1	212	> 50	> 10	> 10	R5	1.74	0.039	16.8	0.67
	0377-M2 (HQ875343)	+	–	31.9	339	> 50	0.31	1.98	R5	4.15	0.038	0.6	0.09
	0377-M3 (EU031226)	+	–	20.4	123	> 50	1.46	3.31	R5	> 10	0.036	43.7	4.13
	0377-M4 (EU0311227)	+	–	22.3	148	> 50	2.43	7.58	R5	> 10	0.056	31.3	3.27
	0377-M5 (HQ875344)	+	–	< 20	214	> 50	> 10	> 10	R5	3.19	0.038	0.3	0.05
	0377-I1 (JQ003579)	+	+	28.7	1056	> 50	0.03	0.01	R5	2.97	0.019	4.5	0.25
978	0978-M1 (HQ875346)	+	+	< 20	626	> 50	0.07	0.03	R5	5.71	0.086	3.1	0.22
	0978-M2 (EU031126)	+	+	< 20	5543	> 50	0.13	0.07	R5	> 10	0.078	2.1	0.11
	0978-M3 (HQ875347)	+	+	< 20	3900	> 50	> 10	> 10	R5	0.15	0.021	0.4	0.10
	0978-I1 (EU031128)	+	+	< 20	2489	> 50	0.10	0.06	R5	> 10	0.062	5.7	0.43
	0978-I2 (EU031141)	+	+	883	2277	> 50	0.18	0.16	R5	0.23	0.100	1.6	0.16
	0978-I3 (EU031130)	+	+	< 20	4150	> 50	0.11	0.04	R5	> 10	0.044	3.1	0.19
1021	1021-M1 (JQ003580)	+	+	< 20	990	> 50	0.86	0.48	R5	> 10	0.027	43.9	0.8
	1021-I1 (EU031153)	+	+	< 20	585	> 50	0.18	0.34	R5	3.59	0.039	45.1	0.64
	1021-I2 (EU031150)	+	+	< 20	746	> 50	0.14	0.36	R5	2.36	0.048	1.9	0.11
858	0858-M1 (EU031374)	–	–	1197	2709	< 0.1	0.29	> 10	R5	> 10	0.008	4.6	0.19
	0858-M2 (HQ875345)	–	–	1642	2112	< 0.1	> 10	> 10	R5	0.35	0.005	1.1	0.15

The mAb neutralization and sCD4 inhibitory titers are color coded as follows: a red box indicates an $IC_{50} \leq 0.1 \mu\text{g/mL}$, an orange box indicates $0.1 \mu\text{g/mL} < IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$ and a yellow box indicates an $IC_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$. For the plasma, the color codes are as follows: a red box indicates an $IC_{50} \geq 1:100$ dilution, an orange box indicates $1:20 \leq IC_{50} < 1:100$ and a yellow box indicates an $IC_{50} < 1:20$. For the TZM-bl and PBMC infectivity, the color codes are as follows: a dark green box indicates an infectivity ratio (defined as mean RLU values obtained for the pseudotyped virus compared to mean RLU values obtained with the NL4-3 reference virus) ≥ 10 , a medium green box indicates $1.0 \leq \text{ratio} < 10$ and a light green box indicates a ratio < 1 . Infant clones are highlighted in gray.

variability was observed in infant clones from MIP 1021 with clone 1021-I1 being highly infectious when compared to clone 1021-I2, much less infectious (Table 2). The infectivity levels of clones from MIP 0978 were more homogeneous for both maternal and infant

clones (Table 2). When the four MIPs were considered together, we did not observe any difference in infectivity between maternal and infant clones in TZM-bl cells ($P = 0.60$, mixed model test; Fig. 3A), nor in PBMC cells ($P = 0.31$, mixed model test; Fig. 3B).

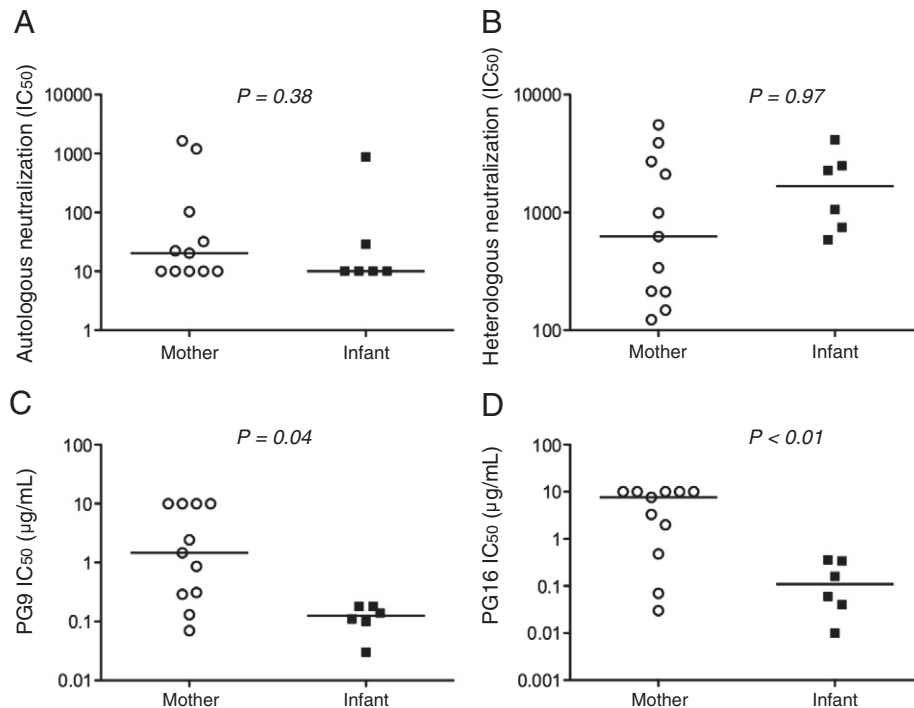


Fig. 2. Sensitivity to neutralization of mother- and infant-derived Env-pseudotyped viruses. The neutralization sensitivity of maternal- (○) and infant- (■) derived Env-pseudotyped viruses to (A) autologous plasmas, (B) heterologous plasmas, (C) PG9 and (D) PG16 was determined using a luciferase reporter gene assay in TZM-bl cells. IC_{50} values were defined as the reciprocal of the serum dilution or antibody concentration (μg/mL) that causes 50% inhibition of virus infection. The horizontal bars indicate the median IC_{50} values. Comparisons between maternal and infant-derived Env-pseudotyped viruses were done using a mixed model test.

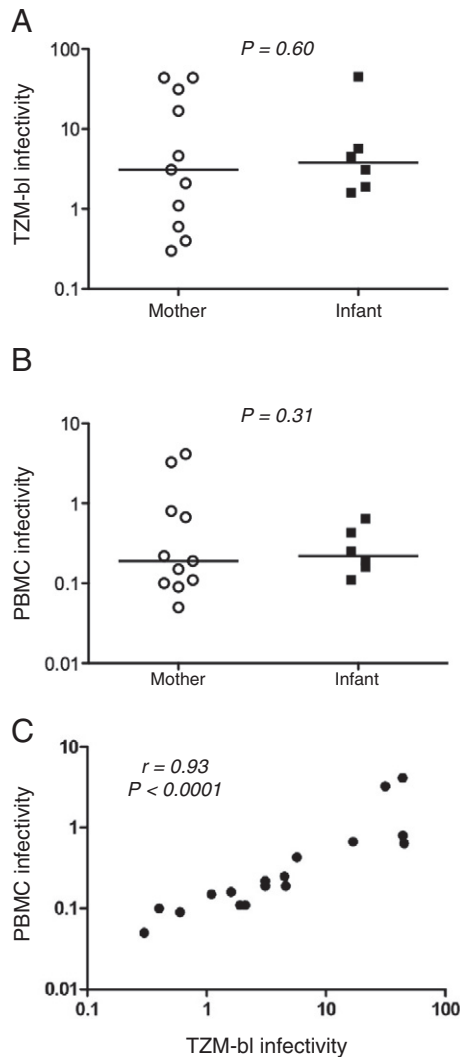


Fig. 3. Viral infectivity of mother- and infant-derived Env-pseudotyped viruses. The capacity of maternal- (○) and infant- (■) derived Env-pseudotyped viruses to infect (A) TZM-bl indicator cells and (B) primary stimulated-peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was evaluated in a single round of infection. Results are expressed as the ratio of mean RLU values obtained for each pseudotyped virus compared to mean RLU values obtained with the NL4.3 reference virus. Comparisons between maternal and infant-derived Env-pseudotyped viruses were done using a mixed model test. (C) Correlation between TZM-bl and PBMC infectivity. The correlation coefficient r and P values were generated using Spearman's correlation test.

Envelope processing and incorporation

To investigate whether the levels of Env processing and/or incorporation in virions contributed to differences in infectivity or had specific features in transmitted variants, we analyzed the expression of Env glycoproteins on maternal and infant pseudotyped viruses by western blot after electrophoresis under reducing and native conditions (Figs. 4A–B). Before electrophoresis, viral proteins from pelleted virions were solubilized and their quantity was normalized for p24 antigen (100 ng per well). Under reducing conditions and using polyclonal anti-gp120 antibody, we detected the expression of both mature gp120 and uncleaved gp160 precursor in almost clones (Fig. 4A). Despite some differences in the extent of processing between clones, we could not detect obvious pattern in Env processing that could distinguish infant from mother clones. Electrophoresis was performed under native conditions to quantify the incorporation of Env under its trimeric form in each variant. To avoid bias due to possible antigenic differences between the various envelopes, we used the anti-gp41

2 F5 and 4E10 monoclonal antibodies to detect the envelope spikes incorporated since all envelope glycoproteins were chimeras containing the same gp41 sequence derived from the NL4-3 virus. Using these antibodies, we detected gp120-gp41 trimers but also various forms of envelope glycoproteins, including gp120-gp41 monomers (~160 kDa) and gp41 trimers (~140 kDa) (Fig. 4B). Analysis by densitometry of the western blots showed that different levels of gp120-gp41 trimers were incorporated into viruses (Fig. 4B). For most viruses, the level of Env trimers incorporation correlated with the infectivity level, when analyzing the ratio trimer/p24 ($r = 0.82$, $P < 0.0001$; Fig. 4C). However, despite variability in incorporation levels of Env trimers into virions, these levels did not distinguish the maternal from the infant viruses ($P = 0.23$, mixed model test; Fig. 4D).

Sensitivity to entry inhibitors

The co-receptor usage of the infectious Env-pseudotyped viruses was evaluated using U373-MAGI cell lines that stably express the CD4 receptor and either the CCR5 or CXCR4 co-receptors. All viruses exhibited a CCR5 tropism. We next investigated the sensitivity of maternal and infant clones to soluble CD4 (sCD4) and TAK-779, a CCR5 antagonist. All maternal and infant exhibited a relatively homogeneous sensitivity to TAK-779, with IC_{50} ranging from 0.019 to 0.100 $\mu\text{g/mL}$. No statistically significant difference was observed between maternal and infant viruses ($P = 0.62$, mixed model test; Fig. 5A). Sensitivity to sCD4 was considerably heterogeneous within the four mother–infant pairs (IC_{50} range: 0.15 to $> 10 \mu\text{g/mL}$) (Table 2). When clones from the four MIPs were considered in aggregate, we did not observe any difference in sensitivity to sCD4 between maternal and infant clones ($P = 0.60$, mixed model test; Fig. 5B). The sensitivity to sCD4 was associated with infectivity: the most resistant variants were those that were most infectious ($r = 0.54$, $P = 0.02$; Fig. 5C). In contrast, the sensitivity to sCD4 was not associated with the level of Env trimers incorporation ($r = 0.25$, $P = 0.34$; Fig. 5D).

Antigenic and functional properties according to PNGS at positions N301 and N384

The two PNGS at positions 301 and 384 were present in all infant clones whereas they were not uniformly present in maternal clones. Maternal clones from pair 0377 harbored either N301 or N384, with one clone (0377-M1) N301[−] N384⁺ and four clones (0377-M2–M5) N301⁺ N384[−]. The two maternal clones from pair 0858 were N301[−] N384[−] whereas the three maternal clones from pair 0978 and the unique maternal clone from pair 1021 were N301⁺ N384⁺. It should be noted that given the small number of functional pseudotyped viruses obtained, we could not test maternal clones from pairs 0978 and 1021 that were N301[−] and/or N384[−], nor infant clones from pair 0858 that were N301⁺ N384⁺. Nevertheless, our data suggested that the presence of N301 in presence or not of N384 conferred higher resistance to autologous neutralization ($P = 0.01$, Mann Whitney test). Indeed, maternal clones 0377-M2 to M5 (N301⁺ N384[−]) and infant clone 0377-I1 (N301⁺ N384⁺) presented a higher resistance to autologous neutralization (IC_{50} range: < 20 –31.9) compared to maternal clone 0377-M1 (N301[−] N384⁺; IC_{50} : 103.1). All maternal and infant clones from pairs 0978 and 1021 (N301⁺ N384⁺), except infant clone 0978-I2, were highly resistant to autologous maternal plasma ($IC_{50} < 20$) whereas maternal clones from pair 0858 (N301[−] N384[−]) were highly sensitive to autologous neutralization (IC_{50} : 1197 and 1642). Moreover, the absence of both PNGS at positions N301 and N384 compared to the absence of N301 alone, could increase neutralization sensitivity. Indeed, maternal clones from pair 0858 (N301[−] N384[−]) were more sensitive to autologous neutralization than maternal clones from pair 0377 (N301[−] N384⁺ or N301⁺ N384[−]). All together, these results may suggest that both N301 and N384 could be involved in sensitivity to autologous neutralization.

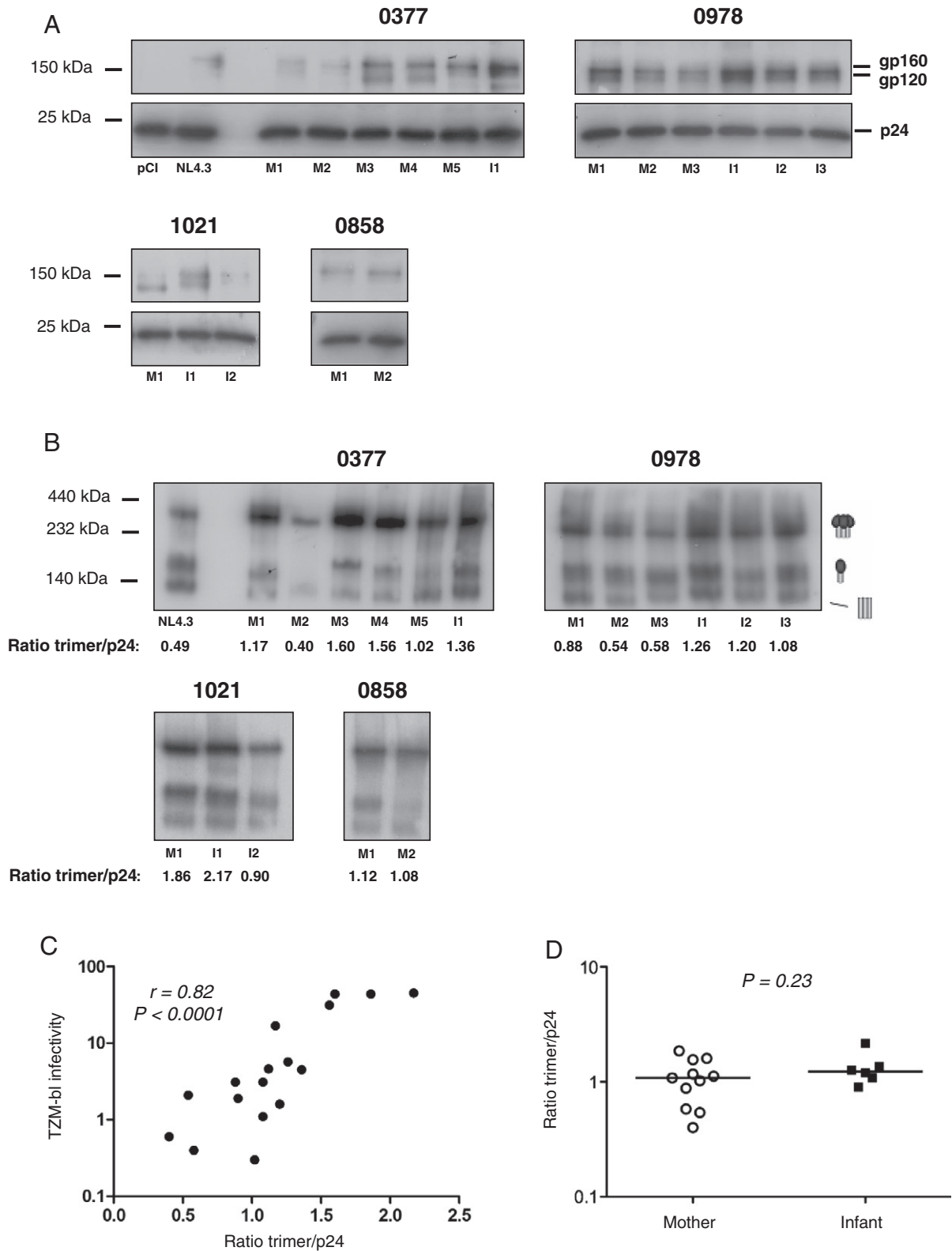


Fig. 4. Env processing and incorporation in mother- and infant-derived Env-pseudotyped viruses. Analysis of the Env glycoprotein composition was performed by western blotting after (A) SDS-PAGE under reducing conditions or (B) Blue-Native-PAGE (BN-PAGE) under native conditions. SDS-PAGE blots were revealed with polyclonal anti-gp120 or anti-p24 antibodies; BN-PAGE blots were revealed using anti-gp41 2F5 and 4E10 monoclonal antibodies (see [Materials and methods](#)). To quantify the incorporation of Env under its trimeric form, the gp160 trimer/p24 ratio was calculated for each Env-pseudotyped virus. (C) Correlation between trimers incorporation (gp160 trimer/p24 ratio) and viral infectivity in TZM-bl cells. The correlation coefficient r and P values were generated using Spearman's correlation test. (D) Comparison of trimers incorporation (gp160 trimer/p24 ratio) between maternal and infant-derived Env-pseudotyped viruses using a mixed model test. The horizontal bars indicate the median values of gp160 trimer/p24 ratios.

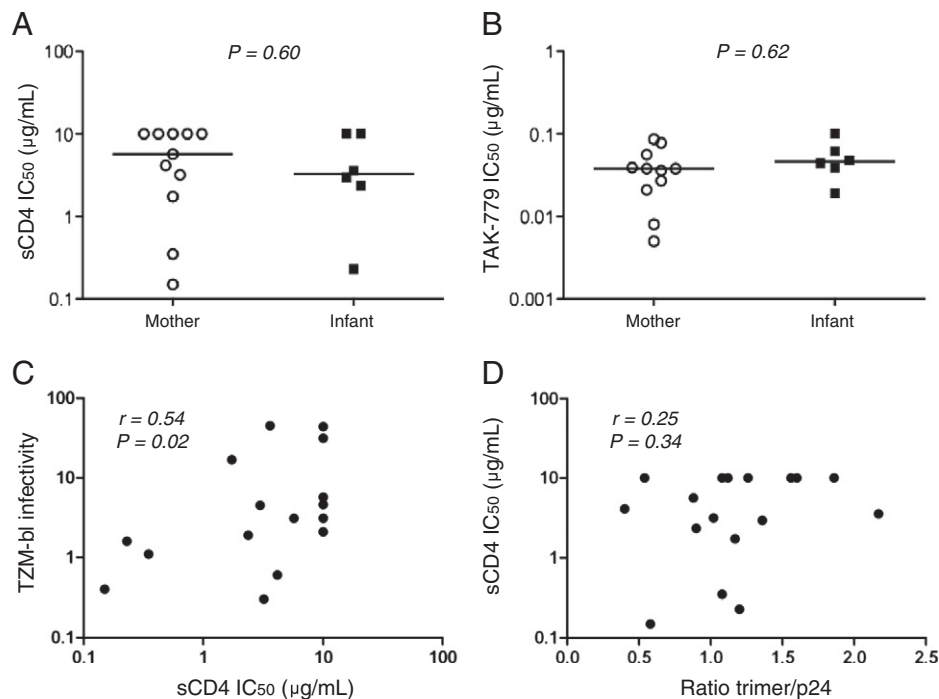


Fig. 5. Sensitivity to entry inhibitors of mother- and infant-derived Env-pseudotyped viruses. The sensitivity of maternal (○) and infant (■) clones to (A) sCD4 and (B) TAK-779 was determined using a luciferase reporter gene assay in T2M-bl cells. IC₅₀ values were defined as the inhibitor concentration (µg/mL) that causes 50% inhibition of virus infection. The horizontal bars indicate the median IC₅₀ values. Comparisons between maternal and infant-derived Env-pseudotyped viruses were done using a mixed model test. (C) Correlation between sensitivity to sCD4 and infectivity in T2M-bl cells. (D) Correlation between sensitivity of sCD4 and Env trimers density. The correlation coefficients r and P values were generated using Spearman's correlation test.

We next compared the functional properties according to the presence or not of PNGS at positions N301 and/or N384. We observed a wide range of sensitivity to sCD4 and infectivity levels whatever the presence or not of N301 (sCD4 IC₅₀ range: 0.15 to >10 µg/mL vs 0.35 to >10 µg/mL; T2M-bl cells range: 0.3 to 45.1 vs 1.1 to 16.8) or N384 (sCD4 IC₅₀ range: 0.15 to >10 µg/mL vs 0.35 to >10 µg/mL; T2M-bl ratio range: 0.4 to 45.1 vs 0.4 to 43.7). These results suggested that N301 and N384 PNGS did not seem to be involved in infectivity or sensitivity to sCD4.

Discussion

During perinatal transmission of HIV-1, acquisition of a homogeneous genetic restricted viral population has been regularly observed, suggesting the presence of selective pressures. The viral properties of perinatally transmitted viruses remain incompletely understood. In this study, we compared the biological properties of 17 Env-pseudotyped viruses derived from variants of mother–infant pairs infected by HIV-1 strains of the CRF01_AE clade. We determined their sensitivity to neutralization by autologous and heterologous sera as well as by broadly neutralizing mAbs. We did not find any significant difference in neutralization sensitivity between maternal and infant clones by either autologous or heterologous sera. However, it should be noted that in most cases maternal variants displayed a low or undetectable neutralizing sensitivity to autologous maternal plasma. As maternal plasma samples were collected before the timing at which *env* sequences were obtained, it may be possible that maternal clones had started to evolve to escape earlier antibodies. Nevertheless, one variant in an infant (clone 0978-I2 from pair 0978) was more sensitive to autologous maternal plasma than all tested maternal variants. Its presence in the infant suggested a low impact of maternal antibodies on the selection of transmitted variants. This observation confirmed recent studies suggesting that the genetic bottleneck in vertical transmission is not driven by selection of neutralization-resistant variants from the maternal viral population

(Kishko et al., 2011; Russell et al., 2011). The data obtained with b12 could not be compared between maternal and infant clones since most of them (15/17) were found resistant to this antibody. This low susceptibility to b12 is consistent with a recent phenotypic study that showed that only one out of 35 CRF01_AE Env-recombinant viruses was susceptible to b12 (Utachee et al., 2009). In contrast, all the transmitted viruses in the infants were highly sensitive to PG9 and PG16 (IC₅₀ <0.2 µg/mL and <0.4 µg/mL, respectively), significantly more sensitive than the maternal variants. This observation might indicate that PG9/PG16-sensitive variants would exhibit functional properties conferring a selective advantage for the mother-to-infant transmission. If confirmed in a larger population, it would suggest that PG9 and/or PG16 might be interesting for immunoprophylaxis of MTCT.

All maternal and infant clones were R5-tropic and similarly sensitive to TAK-779, a CCR5 antagonist. In contrast, both maternal and infant clones displayed a heterogeneous sensitivity to sCD4, but no statistically significant difference was observed between maternal and infant clones. This is consistent with a recent study performed on 5 clade B MIPs, in which all infant clones exhibited a wide range of sCD4 sensitivity, similar to that of maternal clones (Kishko et al., 2011). Our study also indicated that the viral infectivity levels in a single round of infection of both T2M-bl cells and PBMCs did not differ between maternal and infant variants despite a considerable variability in both variants. Working with pseudotyped viruses, we could not compare their replicative fitness in multiple rounds of infection and we cannot exclude a better replicative fitness of transmitted viruses. Previous studies performed on clade C MIPs have shown higher rates of replicative fitness of transmitted viruses than non-transmitted viruses despite, as we observed, a lack of difference between their infectivity levels (Kong et al., 2008; Zhang et al., 2010a). Similarly to susceptibility to sCD4 and infectivity levels, our data of Env processing efficiency and Env trimers incorporation levels did not seem to differ between maternal and infant clones. However, we observed that higher levels of Env trimers incorporation in virus particles correlated with increased infectivity levels. The most infectious virions were also those

that were the most resistant to sCD4, but surprisingly their resistance to sCD4 was not linked to a higher trimers density. Although several modes of sCD4-mediated inhibition were described, *i.e.* competitive inhibition, gp120 shedding (Moore et al., 1991; Orloff et al., 1993) or short-lived activated state of gp120 (Haim et al., 2009), these results suggested a decreased affinity of the envelope glycoprotein trimer of the most infectious virions for sCD4 and a possible biological advantage of virions expressing trimers adopting a conformation that better occludes the CD4 binding site. Together, these results suggested that the quantity of Env trimers rather than their affinity for the CD4 receptor, by facilitating the interaction with the CD4 receptor at the cell surface, modulates the infectivity of virions. Because all our pseudotyped viruses harbor the same transmembrane glycoprotein derived from NL4.3 prototype strain, the differences in Env incorporation must be attributed to the gp120 region only.

We previously observed a high degree of conservation of two PNGS in infant viruses, at positions N301 in V3 and N384 in C3, and hypothesized that they may confer a selective advantage for transmissibility of the virus to infants (Samleerat et al., 2008). We therefore compared the antigenic and functional properties of pseudotyped viruses according to the presence or not of N301 and/or N384. Despite the low number of functional viruses obtained, we could make some observations confirming that these two PNGS may play a role in resistance to autologous sera. This is consistent with previous studies that showed by *in vitro* studies that N301 was associated with a decrease in sensitivity of HIV-1 to neutralization by CD4BS antibodies (Koch et al., 2003; Malenbaum et al., 2000). However, PNGS at these two positions were not associated with infectivity or sensitivity to sCD4.

In conclusion, although limited in samples size, our study suggests that both the founder/transmitted viruses of the CRF01_AE clade present in infants and the variants present in their chronically infected mothers display a wide spectrum of biological properties, albeit the genetic bottleneck that occurred during transmission. Neither Env processing, Env incorporation efficiency, infectivity level, nor sensitivity to sCD4 or TAK-779 was associated with transmission. In other words, we did not find any specific property that would explain the selection of the founder/transmitted viruses, except sensitivity to PG9 and PG16. Maternal variants were less sensitive to neutralization by PG9 and PG16 than the founder/transmitted variants present in the infants. These data may suggest that the development of resistance to these antibody specificities could have some detrimental effect for the mother-to-child transmission of HIV-1. This observation may have implications for the development of prophylactic strategies to prevent MTCT.

Materials and methods

Study population

We selected samples from four mother–infant pairs (# 0377, 0858, 0978 and 1021) enrolled in the “Perinatal HIV Prevention Trial” cohort (Lallemant et al., 2000), that were described in a previous study (Samleerat et al., 2008). Env clones from these four pairs corresponded to a 1.2 kb fragment of the VI–V5 region covering almost the entire HIV-1 *env* gp120 gene (from upstream V1 to downstream V5) previously cloned in pCR2.1 vector (Invitrogen). Accession numbers are indicated in Table 2.

Construction of chimeric *env* genes

In order to obtain complete gp160 *env*, we constructed chimeric *env* genes in a NL4.3 backbone as described previously (Braibant et al., 2010). Briefly, the complete gp160 NL4.3 *env* gene was inserted into the *EcoRI* site of the pCR2.1 vector. Part of the *env* gene coding for V1 to V5 regions was extracted from this construct using *NdeI*

and *MfeI* restriction (New England BioLabs) and replaced by the corresponding gp120 sequence of interest excised from the pCR2.1 vector by digestion with the same enzymes. Chimeric *env* genes containing each gp120 sequence inserted in the NL4.3 backbone were then subcloned into the *EcoRI* site of the pCI expression vector (Promega).

Generation of *env*-pseudotyped viruses

Env-pseudotyped viruses were generated as described previously (Samleerat et al., 2009). 3.5×10^6 293T cells were cotransfected with 12 µg of each pCI-*env* plasmid and 8 µg of pNL4.3.LUC.R-E- (Connor et al., 1995), using phosphate calcium (Invitrogen). Viral supernatants were collected 72 h later, purified by filtration (0.45 µm filter) and stored as aliquots at -80°C . Viral infectivity was monitored by infection of 1×10^4 TZM-bl cells with 100 µL of serial 5-fold dilutions of the viral supernatants in quadruplicate in the presence of 30 µg/mL of DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48 h, using the Bright Glo luciferase assay (Promega) and a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies) to measure luciferase activity in cell lysates. Results with Relative Light Unit (RLU) values > 2.5 times the negative control (cells alone) were considered positive.

Cell culture

293T and U373-MAGI cell lines were grown at 37°C and 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 IU of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin). U373-MAGI-CXCR4 and U373-MAGI-CCR5 cells were cultured in medium supplemented with 1 µg/mL of puromycin and 100 µg/mL of hygromycin B. TZM-bl cells were maintained in DMEM + pyruvate supplemented with 10% FCS, 50 µg/mL of gentamicin and 25 mM of HEPES (Platt et al., 1998; Wei et al., 2002). Frozen peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-1 negative blood donors were treated with 5 µg/mL of phytohemagglutinin in RPMI 1640 medium supplemented with 10 ng/mL of interleukin-2 (Roche), 20% FCS and antibiotics for 3 days. They were then washed and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with interleukin-2, 20% FCS and antibiotics.

Determination of co-receptor usage

Co-receptor usage was determined using the U373-MAGI cell lines. U373-MAGI cells expressed the CD4 receptor with either the CXCR4 co-receptor (U373-MAGI-CXCR4) or the CCR5 co-receptor (U373-MAGI-CCR5). 1.5×10^4 cells were plated the day prior infection. Cells were infected with 25 µL of a normalized p24 amount (10 ng) of pseudotyped viruses for 2 h at 37°C . Then, 175 µL of DMEM supplemented with 20 µg/mL of DEAE-dextran and 5% FCS were added. 48 h after infection, the luciferase activity was measured and the viral tropism was determined.

Neutralization and inhibition assay

Sensitivity to autologous and heterologous plasmas, mAbs b12, PG9 and PG16, and to sCD4 and TAK-779 entry inhibitors, were assessed in duplicate in TZM-bl cells. After titration, pseudotyped virus stocks were diluted to obtain 1000 TCID₅₀/mL in growth medium. Aliquots of 25 µL were then incubated for 1 h at 37°C with 75 µL of either two-fold serial dilutions of heat-inactivated serum (1:20 to 1:10240), or b12 (50 µg/mL to 0.1 µg/mL; Polymun Scientific), or sCD4 (10 µg/mL to 0.02 µg/mL; NIBSC), or three-fold serial dilutions of PG9 and PG16 (10 µg/mL to 0.005 µg/mL; IAVI). Then 1×10^4 TZM-bl cells were added to the virus/serum mixture in the presence of 30 µg/mL of DEAE-dextran. Luciferase activity was measured 48 h after infection as described above. Results were expressed as mean values. IC₅₀ values

were defined as the reciprocal of the serum dilution or antibody concentration required to reduce RLU by 50%.

For TAK-779 inhibition, 8×10^3 TZM-bl cells per wells were prepared the day prior infection. Cells were first treated for 1 h with 75 μ L of two-fold serial dilutions of TAK-779 (0.2 μ g/mL to 0.0004 μ g/mL; NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) before adding 25 μ L of pseudotyped viruses normalized to 1000 TCID₅₀/mL. 100 μ L of DMEM medium supplemented with 30 μ g/mL DEAE-dextran were then added to cells. Luciferase activity was measured 48 h after infection as described above.

Viral infectivity in TZM-bl cells and peripheral blood mononuclear cells

Viral infectivity was determined in quadruplicate in TZM-bl and PBMC cells. 25 μ L of virus stock normalized at 10 ng p24 were added to 75 μ L of culture medium. 1×10^4 TZM-bl cells or 1×10^5 PBMC cells were added to viruses in the presence of 30 μ g/mL DEAE-dextran. Luciferase activity was measured in the cells lysates 48 h after infection. Results were expressed as a ratio of mean RLU values obtained for each virus compared to mean RLU values obtained with the NL4.3 virus.

Processing and incorporation of envelope glycoproteins

Viral supernatants were overlaid on a 20% sucrose cushion, and viral particles were pelleted at 87,000 g for 1.5 h at 4 °C. Viral pellets were solubilized for 5 min in 100 μ L of phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 1% Triton X-100 and an antiprotease cocktail (aprotinin 2 μ g/mL, leupeptin 2 μ g/mL, phenylmethanesulfonylfluoride 1 mM). P24 antigen content was determined by ELISA (INNOTEST® HIV Antigen mAb; Innogenetics) and aliquots of the resuspended pellets were stored as at –80 °C until used. Glycoproteins analyses were performed by western blotting after SDS-PAGE and Blue-Native-PAGE (BN-PAGE).

SDS-PAGE

Samples containing 100 ng p24 were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer in the presence of dithiothreitol, and were separated by electrophoresis in a SDS-10% polyacrylamide gel. The proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane for 1.5 h at 100 V. Blots were probed for gp120 and p24 with specific goat polyclonal antibodies (1/1000; AbD Serotec) in Tris buffer saline (TBS) containing 2% nonfat milk by incubation overnight at 4 °C, followed after washings by incubation with a horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-goat-IgG from rabbit (1/5000; Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature. Immunoblots were developed using a luminol-based enhanced chemiluminescence substrate (ECL Plus Western Blotting Detection System; Amersham). Env gp120 and gp160, as well as p24 proteins were quantified using the Bio-1D++ analysis software (Vilber Lourmat; Deutschland GmbH).

BN-PAGE

To analyze Env gp under native conditions, we used a modified BN-PAGE protocol (Binley et al., 2010; Crooks et al., 2007; Moore et al., 2006). Solubilized virions were normalized for p24 amount (100 ng). 2× native sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% glycerol, 0.1% Coomassie blue G250) was added to samples prior to loading onto a 4 to 15% Mini-PROTEAN® TGX™ gel (BioRad). High molecular weight calibration Kit for native electrophoresis (Amersham) was used for size determination. Samples were separated at 4 °C for 2.5 h at 100 V with TG 1X (25 mM Tris–192 mM Glycine) containing 0.002% Coomassie blue as cathode buffer and TG 1× as anode buffer. The gel was then transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for 1.5 h at 100 V. PVDF membranes were destained with a 30% methanol/10% acetic acid solution, then with 100% methanol. Blots were probed with mAbs 2F5 and 4E10 (1 μ g/mL; Polymun)

in TBS containing 2% nonfat milk by incubation overnight at 4 °C, followed after washings by incubation with a horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human-IgG from goat (1/5000; Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature. Immunoblots were developed with a luminol-based enhanced chemiluminescence substrate (ECL Plus Western Blotting Detection System; Amersham). Env trimers were quantified using the Bio-1D++ analysis software (Vilber Lourmat; Deutschland GmbH).

Statistical analyses

A mixed-model approach was used to compare each biological property between maternal and infant clones. This is the most suitable technique for estimating differences according to the origin (maternal or infant) of the clone, with allowance for the correlation structure of properties within each MIP and for differences in the number of observations within each MIP. For each property, the origin of the clone was considered as the fixed effect and MIP's effect was assumed to be random. In cases in which the IC₅₀ values were <20, the midpoint value between 0 and 20, 10, was assigned. When the IC₅₀ values were >10, a value of 10 was assigned. Significance was reported when $P \leq 0.05$. Correlations between two biological properties were examined with the Spearman's correlation test. Biological properties according to PNGS at positions N301 or N384 were compared with the Mann–Whitney test.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites (ANRS, Paris, France). Suzie Thenin was a recipient of a doctoral fellowship from the ANRS, and from the Fonds de dotation Pierre Bergé – Sidaction. We sincerely thank Pascal Poinard and IAVI for providing us with the PG9 and PG16 mAbs, and Bruno Giraudeau for his help in statistical analyses. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4.3.LUC.R-E- from Dr. Nathaniel Landau; TZM-bl from Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun WU and Tranzyme Inc.

References

- Ahmad, N., Baroudy, B.M., Baker, R.C., Chappey, C., 1995. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope V3 region isolates from mothers and infants after perinatal transmission. *J. Virol.* 69 (2), 1001–1012.
- Barin, F., Jourdain, G., Brunet, S., Ngo-Giang-Huong, N., Weerawatgoompa, S., Karnchanamayul, W., Ariyadej, S., Hansudewechakul, R., Achalapong, J., Yuthavisuthi, P., Ngampiyasakul, C., Bhakeecheep, S., Hemwutthiphon, C., Lallamant, M., 2006. Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 193 (11), 1504–1511.
- Binley, J.M., Ban, Y.E., Crooks, E.T., Eggink, D., Osawa, K., Schief, W.R., Sanders, R.W., 2010. Role of complex carbohydrates in human immunodeficiency virus type 1 infection and resistance to antibody neutralization. *J. Virol.* 84 (11), 5637–5655.
- Bongertz, V., Costa, C.I., Veloso, V.G., Grinsztejn, B., Filho, E.C., Calvet, G., Pilotto, J.H., 2002. Neutralization titres and vertical HIV-1 transmission. *Scand. J. Immunol.* 56 (6), 642–644.
- Braibant, M., Xie, J., Samri, A., Agut, H., Autran, B., Barin, F., 2010. Disease progression due to dual infection in an HLA-B57-positive asymptomatic long-term nonprogressor infected with a nef-defective HIV-1 strain. *Virology* 405 (1), 81–92.
- Burton, D.R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S.J., Thornton, G.B., Parren, P.W., Sawyer, L.S., Hendry, R.M., Dunlop, N., Nara, P.L., et al., 1994. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 266 (5187), 1024–1027.
- Chohan, B., Lang, D., Sagar, M., Korber, B., Lavreys, L., Richardson, B., Overbaugh, J., 2005. Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1–V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79 (10), 6528–6531.
- Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S., Landau, N.R., 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206 (2), 935–944.
- Crooks, E.T., Moore, P.L., Franti, M., Cayan, C.S., Zhu, P., Jiang, P., de Vries, R.P., Wiley, C., Zharkikh, I., Schulke, N., Roux, K.H., Montefiori, D.C., Burton, D.R., Binley, J.M., 2007. A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology* 366 (2), 245–262.

- Derdeyn, C.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Mokili, J.L., Muldoon, M., Denham, S.A., Heil, M.L., Kasolo, F., Musonda, R., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Korber, B.T., Allen, S., Hunter, E., 2004. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 303 (5666), 2019–2022.
- Dickover, R.E., Garratty, E.M., Plaeger, S., Bryson, Y.J., 2001. Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J. Virol.* 75 (5), 2194–2203.
- Dickover, R., Garratty, E., Yusim, K., Miller, C., Korber, B., Bryson, Y., 2006. Role of maternal autologous neutralizing antibody in selective perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 escape variants. *J. Virol.* 80 (13), 6525–6533.
- Englund, J., Glezen, W.P., Piedra, P.A., 1998. Maternal immunization against viral disease. *Vaccine* 16 (14–15), 1456–1463.
- Frost, S.D., Liu, Y., Pond, S.L., Chappey, C., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Little, S.J., Richman, D.D., 2005. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope variation and neutralizing antibody responses during transmission of HIV-1 subtype B. *J. Virol.* 79 (10), 6523–6527.
- Guevara, H., Casseb, J., Zijenah, L.S., Mbizvo, M., Ocegüera III, L.F., Hanson, C.V., Katzenstein, D.A., Hendry, R.M., 2002. Maternal HIV-1 antibody and vertical transmission in subtype C virus infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29 (5), 435–440.
- Haim, H., Si, Z., Madani, N., Wang, L., Courter, J.R., Princiotto, A., Kassa, A., DeGrace, M., McGee-Estrada, K., Mefford, M., Gabuzda, D., Smith III, A.B., Sodroski, J., 2009. Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. *PLoS Pathog.* 5 (4), e1000360.
- Hengel, R.L., Kennedy, M.S., Steketee, R.W., Thea, D.M., Abrams, E.J., Lambert, G., McDougal, J.S., 1998. Neutralizing antibody and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14 (6), 475–481.
- Husson, R.N., Lan, Y., Kojima, E., Venzon, D., Mitsuya, H., McIntosh, K., 1995. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: autologous neutralizing antibody, virus load, and virus phenotype. *J. Pediatr.* 126 (6), 865–871.
- Kishko, M., Somasundaran, M., Brewster, F., Sullivan, J.L., Clapham, P.R., Luzuriaga, K., 2011. Genotypic and functional properties of early infant HIV-1 envelopes. *Retrovirology* 8 (1), 67.
- Koch, M., Pancera, M., Kwong, P.D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W.A., Sodroski, J., Wyatt, R., 2003. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* 313 (2), 387–400.
- Kong, X., West, J.T., Zhang, H., Shea, D.M., M'Soka, T.J., Wood, C., 2008. The human immunodeficiency virus type 1 envelope confers higher rates of replicative fitness to perinatally transmitted viruses than to nontransmitted viruses. *J. Virol.* 82 (23), 11609–11618.
- Lallemant, M., Jourdain, G., Le Coeur, S., Kim, S., Koetsawang, S., Comeau, A.M., Phoolcharoen, W., Essex, M., McIntosh, K., Vithayasai, V., 2000. A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N. Engl. J. Med.* 343 (14), 982–991.
- Lamers, S.L., Sleasman, J.W., She, J.X., Barrie, K.A., Pomeroy, S.M., Barrett, D.J., Goodenow, M.M., 1994. Persistence of multiple maternal genotypes of human immunodeficiency virus type 1 in infants infected by vertical transmission. *J. Clin. Invest.* 93 (1), 380–390.
- Lathey, J.L., Tsou, J., Brinker, K., Hsia, K., Meyer III, W.A., Spector, S.A., 1999. Lack of autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and macrophage tropism are associated with mother-to-infant transmission. *J. Infect. Dis.* 180 (2), 344–350.
- Lynch, J.B., Nduati, R., Blish, C.A., Richardson, B.A., Mabuka, J.M., Jalalian-Lechak, Z., John-Stewart, G., Overbaugh, J., 2011. The breadth and potency of passively acquired human immunodeficiency virus type 1-specific neutralizing antibodies do not correlate with the risk of infant infection. *J. Virol.* 85 (11), 5252–5261.
- Malenbaum, S.E., Yang, D., Cavacini, L., Posner, M., Robinson, J., Cheng-Mayer, C., 2000. The N-terminal V3 loop glycan modulates the interaction of clade A and B human immunodeficiency virus type 1 envelopes with CD4 and chemokine receptors. *J. Virol.* 74 (23), 11008–11016.
- Moore, J.P., McKeating, J.A., Norton, W.A., Sattentau, Q.J., 1991. Direct measurement of soluble CD4 binding to human immunodeficiency virus type 1 virions: gp120 dissociation and its implications for virus-cell binding and fusion reactions and their neutralization by soluble CD4. *J. Virol.* 65 (3), 1133–1140.
- Moore, P.L., Crooks, E.T., Porter, L., Zhu, P., Cayanan, C.S., Grise, H., Corcoran, P., Zwick, M.B., Franti, M., Morris, L., Roux, K.H., Burton, D.R., Binley, J.M., 2006. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 80 (5), 2515–2528.
- Orloff, S.L., Kennedy, M.S., Belperron, A.A., Maddon, P.J., McDougal, J.S., 1993. Two mechanisms of soluble CD4 (sCD4)-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infectivity and their relation to primary HIV-1 isolates with reduced sensitivity to sCD4. *J. Virol.* 67 (3), 1461–1471.
- Pancera, M., McLellan, J.S., Wu, X., Zhu, J., Changela, A., Schmidt, S.D., Yang, Y., Zhou, T., Phogat, S., Mascola, J.R., Kwong, P.D., 2010. Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1. *J. Virol.* 84 (16), 8098–8110.
- Pasquier, C., Cayrou, C., Blancher, A., Tourne-Petheil, C., Berrebi, A., Tricoire, J., Puel, J., Izopet, J., 1998. Molecular evidence for mother-to-child transmission of multiple variants by analysis of RNA and DNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72 (11), 8493–8501.
- Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B., Kabat, D., 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72 (4), 2855–2864.
- Russell, E.S., Kwiek, J.J., Keys, J., Barton, K., Mwapasa, V., Montefiori, D.C., Meshnick, S.R., Swanstrom, R., 2011. The genetic bottleneck in vertical transmission of subtype C HIV-1 is not driven by selection of especially neutralization-resistant virus from the maternal viral population. *J. Virol.* 85 (16), 8253–8262.
- Safrit, J.T., Ruprecht, R., Ferrantelli, F., Xu, W., Kitabwalla, M., Van Rompay, K., Marthas, M., Haigwood, N., Mascola, J.R., Luzuriaga, K., Jones, S.A., Mathieson, B.J., Newell, M.L., 2004. Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 35 (2), 169–177.
- Samleerat, T., Braibant, M., Jourdain, G., Moreau, A., Ngo-Giang-Huong, N., Leechanachai, P., Hemvuttiphon, J., Hinjiranandana, T., Changchit, T., Warachit, B., Suraseranivong, V., Lallemand, M., Barin, F., 2008. Characteristics of HIV type 1 (HIV-1) glycoprotein 120 env sequences in mother–infant pairs infected with HIV-1 subtype CRF01_AE. *J. Infect. Dis.* 198 (6), 868–876.
- Samleerat, T., Thenin, S., Jourdain, G., Ngo-Giang-Huong, N., Moreau, A., Leechanachai, P., Ithisuknanth, P., Pagdi, K., Wannarit, P., Sangsawang, S., Lallemand, M., Barin, F., Braibant, M., 2009. Maternal neutralizing antibodies against a CRF01_AE primary isolate are associated with a low rate of intrapartum HIV-1 transmission. *Virology* 387 (2), 388–394.
- Saphire, E.O., Parren, P.W., Barbas III, C.F., Burton, D.R., Wilson, I.A., 2001. Crystallization and preliminary structure determination of an intact human immunoglobulin, b12: an antibody that broadly neutralizes primary isolates of HIV-1. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57 (Pt 1), 168–171.
- Scarlati, G., 2004. Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries. *AIDS Rev.* 6 (2), 67–78.
- Scarlati, G., Albert, J., Rossi, P., Hodara, V., Biraghi, P., Muggiasca, L., Fenyo, E.M., 1993a. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. *J. Infect. Dis.* 168 (1), 207–210.
- Scarlati, G., Leitner, T., Halapi, E., Wahlberg, J., Marchisio, P., Clerici-Schoeller, M.A., Wigzell, H., Fenyo, E.M., Albert, J., Uhlen, M., et al., 1993b. Comparison of variable region 3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 from infected children with the RNA and DNA sequences of the virus populations of their mothers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (5), 1721–1725.
- Utachee, P., Jinnopatt, P., Isarangkura-Na-Ayuthaya, P., de Silva, U.C., Nakamura, S., Siripanyaphinyo, U., Wichukhinda, N., Tokunaga, K., Yasunaga, T., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., Kameoka, M., 2009. Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01_AE env gene derived from HIV-1-infected patient, residing in central Thailand. *Microbes Infect.* 11 (3), 334–343.
- Verhofstede, C., Demecheleer, E., De Cabooter, N., Gaillard, P., Mwanyumba, F., Claeys, P., Chohan, V., Mandaliya, K., Temmerman, M., Plum, J., 2003. Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env sequence after vertical transmission in mother–child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J. Virol.* 77 (5), 3050–3057.
- Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., Wrin, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., Lehrman, J.K., Priddy, F.H., Olsen, O.A., Frey, S.M., Hammond, P.W., Kaminsky, S., Zamb, T., Moyle, M., Koff, W.C., Poignard, P., Burton, D.R., 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326 (5950), 285–289.
- Wei, X., Decker, J.M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R.B., Kilby, J.M., Saag, M.S., Wu, X., Shaw, G.M., Kappes, J.C., 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (6), 1896–1905.
- Wolinsky, S.M., Wike, C.M., Korber, B.T., Hutto, C., Parks, W.P., Rosenblum, L.L., Kunstman, K.J., Furtado, M.R., Munoz, J.L., 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255 (5048), 1134–1137.
- Wu, X., Parast, A.B., Richardson, B.A., Nduati, R., John-Stewart, G., Mbori-Ngacha, D., Rainwater, S.M., Overbaugh, J., 2006. Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant. *J. Virol.* 80 (2), 835–844.
- Zhang, H., Rola, M., West, J.T., Tully, D.C., Kubis, P., He, J., Kankasa, C., Wood, C., 2010a. Functional properties of the HIV-1 subtype C envelope glycoprotein associated with mother-to-child transmission. *Virology* 400 (2), 164–174.
- Zhang, H., Tully, D.C., Hoffmann, F.G., He, J., Kankasa, C., Wood, C., 2010b. Restricted genetic diversity of HIV-1 subtype C envelope glycoprotein from perinatally infected Zambian infants. *PLoS One* 5 (2), e9294.

III) Etude de la sensibilité à la neutralisation par les anticorps monoclonaux PG9 et PG16 de variants du VIH-1 de sous-type CRF01_AE et B

Article 3

Naturally occurring substitutions of conserved residues in HIV-1 variants of different clades are involved in PG9 and PG16 resistance to neutralization

Suzie THENIN, Emmanuelle ROCH, Tanawan SAMLEERAT, Antoine CHAILLON, Thierry MOREAU, Alain MOREAU, Francis BARIN, Martine BRAIBANT

Article accepté dans J Gen Virol (avril 2012)

Récemment, deux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants, PG9 et PG16, ont été décrits. Ces anticorps reconnaissent un épitope quaternaire exprimé exclusivement sur les

spicules de glycoprotéine d'enveloppe trimérique, et constitué essentiellement de résidus localisés dans les régions conservées des boucles V1/V2 et V3 (Walker *et al.*, 2009). La structure de la gp120 liée à PG9 a montré que la liaison de PG9 impliquait des interactions avec deux glycanes (N160 et N156/N173) et le feuillet C de la boucle V1V2 (McLellan *et al.*, 2011). Les anticorps PG9 et PG16 possèdent une activité neutralisante exceptionnelle en neutralisant 70 à 80% des isolats circulants, suggérant ainsi que le(s) épitope(s) cible(s) seraient hautement conservés au sein de variants du VIH-1 du groupe M.

Lors de l'étude précédemment décrite, nous avons analysé les propriétés antigéniques et fonctionnelles de virus pseudotypés porteurs d'enveloppes de clones maternels et de clones transmis à l'enfant représentatifs de la quasi-espèce virale, au sein de paires mère-enfant infectés par des virus de sous-type CRF01_AE. Cette étude avait mis en évidence une forte hétérogénéité de la sensibilité à PG9 et PG16 des clones maternels (Thenin *et al.*, 2012). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'analyse de variants génétiquement très proches mais présentant des sensibilités différentes à PG9 et PG16 pourrait permettre l'identification de déterminants moléculaires impliqués dans la résistance à la neutralisation par PG9 et PG16. Pour cela nous avons analysé la sensibilité à PG9 et PG16 de 10 virus pseudotypés exprimant des enveloppes issues de trois mères infectées par des virus de sous-type CRF01_AE (Thenin *et al.*, 2012). L'analyse comparative de variants génétiquement très proches mais de sensibilités opposées à la neutralisation par PG9 et PG16 chez deux patients nous a permis d'identifier deux résidus potentiellement responsables de cette propriété. Nous avons confirmé que ces deux résidus très conservés de la gp120, une lysine en position 168 dans la boucle variable V2 et une isoleucine en position 215 dans le domaine constant C2, étaient effectivement impliqués dans la sensibilité à PG9 et PG16. Nous avons en effet montré que la substitution d'une lysine par un acide glutamique en position 168 (K168E) dans un clone de sous-type CRF01_AE entraînait une résistance à la neutralisation par PG9 et PG16, confirmant ainsi dans un virus non-B que la présence d'un résidu basique ou acide en position 168 dans la boucle V2 était un élément important déterminant la sensibilité à ces deux anticorps monoclonaux. Par ailleurs, nous avons observé que la substitution d'une isoleucine par une méthionine en position 215 (I215M) entraînait une résistance à PG9 et/ou PG16 dans des clones de sous-type B et CRF01_AE, montrant ainsi que le résidu M215 avait un impact majeur sur la sensibilité à PG9 et/ou PG16 sur des variants appartenant à deux sous-types différents. La sensibilité aux anticorps monoclonaux b12, 2G12, 2F5 et 4E10 des différents virus pseudotypés sauvages et mutés de sous-type B et CRF01_AE n'était pas modifiée par la

substitution I215M, suggérant que cette substitution n'affectait pas la conformation de la gp120 au moins pour ce qui concerne des régions antigéniques et fonctionnelles majeures.

Cette étude a permis d'identifier deux résidus très conservés de la gp120, une lysine en position 168 dans la boucle V2 et une isoleucine en position 215 dans le domaine constant C2, dont leurs substitutions, K168E et I215M, sont associées à une résistance à PG9 et PG16. Nous avons ainsi validé que l'analyse de la sensibilité à différents anticorps monoclonaux neutralisants de variants naturels génétiquement très proches issus de la quasi-espèce virale d'un individu donné est une stratégie intéressante qui peut fournir des données pertinentes, complémentaires à celles obtenues par l'analyse de la sensibilité à la neutralisation réalisée sur des mutants d'une souche de référence de laboratoire.

**Naturally occurring substitutions of conserved residues in HIV-1 variants
of different clades are involved in PG9 and PG16 resistance to
neutralization**

Running title : Amino acid dependency of PG9 and PG16 epitopes

Suzie Thenin¹, Emmanuelle Roch¹, Tanawan Samleerat^{1,2}, Thierry Moreau³, Antoine
Chaillon¹, Alain Moreau¹, Francis Barin¹ and Martine Braibant^{1*}.

¹ Université François Rabelais, Inserm U966, Tours, France

² Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

³ Université François Rabelais, Inserm U1100, Tours, France

* Corresponding author :

M Braibant, Inserm U966, UFR Médecine, 10 blvd Tonnellé, 37032 Tours cedex, France.

braibant@med.univ-tours.fr

Summary word count : 143

Main text word count : 4371

Number of figures : 5

Number of table :1

33 **Abstract**

34 The recently described anti-HIV-1 human monoclonal antibodies PG9 and PG16 are cross-
35 clade broadly neutralizing. Therefore, it can be postulated that the targeted epitope(s) are
36 highly conserved among variants of the entire group M. We analyzed the sensitivity to PG9
37 and PG16 of pseudotyped viruses carrying envelope glycoproteins from the viral quasispecies
38 of three HIV-1 clade CRF01_AE-infected patients. The broad heterogeneity in sensitivity to
39 PG9 and PG16 despite closely genetically-related envelope glycoproteins issued from single
40 individuals, allowed us to identify two gp120 cross-clade conserved residues, a lysine at
41 position 168 in the V2 loop and an isoleucine at position 215 in the C2 region, whose
42 substitutions were associated with resistance to PG9 and PG16. By site-directed mutagenesis,
43 we confirmed both in clades B and CRF01_AE, that the substitutions K168E and I215M have
44 a major impact on PG9 and PG16 neutralization sensitivity of pseudotyped viruses.

45

46 **Introduction**

47 Elicitation of broadly neutralizing antibodies (NAbs) responses is a key objective that
48 should be reached for an efficient Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) vaccine
49 (Barouch, 2008; Burton *et al.*, 2004; Mascola, 2003; Mascola & Montefiori, 2010; Walker &
50 Burton, 2010). Indeed, NAbs have been shown to confer protection against challenge
51 infection in animal models (Baba *et al.*, 2000; Burton *et al.*, 2011; Hessel *et al.*, 2009a, b,
52 2010; Mascola *et al.*, 1999, 2000; Parren *et al.*, 2001). Until recently, only a handful of
53 broadly neutralizing human monoclonal antibodies (mAbs) had been isolated from HIV-1
54 clade B-infected individuals. Two of them, b12 and 2G12, recognize conformational epitopes
55 located on the gp120 surface unit of the envelope spike, and two others, 2F5 and 4E10,
56 recognize linear epitopes located on the membrane-proximal external region (MPER) of the
57 transmembrane unit gp41 (Mascola & Montefiori, 2010; Walker & Burton, 2010). However,
58 new approaches to recombinant human mAbs isolation developed over the past few years, have
59 led to the identification of new exceptionally potent broadly neutralizing human mAbs
60 (Bonsignori *et al.*, 2011; Corti *et al.*, 2010; Scheid *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2009, 2011;
61 Wu *et al.*, 2010). Among them, VRC01 and related mAbs (Corti *et al.*, 2010; Scheid *et al.*,
62 2011; Wu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010) target the CD4 binding region of gp120, a domain
63 already identified as a major neutralization component of the HIV-1 envelope (Binley *et al.*,
64 2008; Li *et al.*, 2007, Walker *et al.*, 2010). Others, PG9 and PG16 (Doores & Burton, 2010;
65 Walker *et al.*, 2009), CH01-CH04 (Bonsignori *et al.*, 2011) and PGT141-145 (Walker *et al.*,
66 2011) target the V1/V2 region, one of the most variable and highest glycosylated domains of
67 gp120. These antibodies all show a preferential binding to the assembled trimeric spike over
68 monomeric gp120, share specificity for a N-linked glycan at position 160 and are sensitive to
69 changes in conserved V1/V2 and V3 residues. Among these, mAbs PG9 and PG16
70 demonstrated the most remarkable breadth since they neutralize 70-80% of circulating HIV-1

71 isolates, suggesting that the targeted epitope(s) are highly conserved among variants of the
72 entire group M. Recently, the structure of the V1/V2 region in complex with PG9 was
73 reported (McLellan *et al.*, 2011). V1/V2 forms a four-stranded β -sheet domain, in which
74 sequence diversity and glycosylation are largely segregated to strand-connecting loops. The
75 V1/V2 site recognized by PG9 consists primarily of two glycans (N160 and N156/N173
76 glycans) and strand C, located at the edge of the sheet.

77 We recently explored the antigenic and functional properties of pseudotyped viruses
78 expressing gp120 encoded by *env* clones representative of the quasispecies present in mother-
79 infant pairs infected by CRF01_AE viruses, and observed a broad range of sensitivity to PG9
80 and/or PG16 of maternal clones (Thenin *et al.*, 2012). Here, we took advantage of having
81 closely genetically-related gp120 variants to investigate the determinants conferring resistance
82 to these two mAbs.

83

84 **Results and Discussion**

85 **Heterogeneity in sensitivity to PG9 and PG16 of closely related envelope glycoproteins** 86 **issued from a single quasispecies**

87 We selected 10 Env-pseudotyped viruses expressing the almost entire gp120 region issued
88 from the viral quasispecies of three CRF01_AE-infected mothers (cases 0377, 0858 and
89 0978) described in a previous study (Thenin *et al.*, 2012). Sensitivity to PG9 and PG16 (from
90 10 $\mu\text{g/mL}$ to 0.005 $\mu\text{g/mL}$) was analyzed in TZM-bl cells by measuring the luciferase activity
91 48 hours post-infection (Thenin *et al.*, 2012). Five clones from case 0377 presented a broad
92 and continuous range of sensitivity to PG9 (IC_{50} range: 0.31 - $>10 \mu\text{g/mL}$) and to PG16 (IC_{50}
93 range: 1.98 - $>10 \mu\text{g/mL}$) (Table 1). A broader range of sensitivity was observed in case 0978,
94 clone 0978-M3 being resistant to PG9 and PG16 ($\text{IC}_{50} >10 \mu\text{g/mL}$) whereas two other clones,
95 0978-M1 and 0978-M2, were highly sensitive (IC_{50} range: 0.03 - 0.13 $\mu\text{g/mL}$) (Table 1).

96 Similarly, two clones from case 0858 displayed peculiar patterns of neutralization: clone
97 0858-M1 was sensitive to neutralization by PG9 only (IC₅₀: 0.29 µg/mL) but was resistant to
98 PG16 (IC₅₀ >10 µg/mL) whereas clone 0858-M2 was resistant to both mAbs (IC₅₀ >10
99 µg/mL) (Table 1). These results showed the broad heterogeneity in sensitivity to PG9 and
100 PG16 of closely genetically-related envelope glycoproteins derived from single viral
101 quasispecies.

102

103 **Substitution K168E confers neutralization resistance to PG9 and PG16**

104 Clone 0978-M3 from case 0978 was resistant to PG9 and PG16 whereas clones 0978-
105 M1/M2 were highly sensitive to both mAbs. The alignment of Env amino-acid sequences
106 from these three clones revealed that clone 0978-M3 differed from clones 0978-M1/M2 by a
107 unique substitution, glutamic acid (E) *versus* lysine (K), at position 170 in the V2 loop
108 (corresponding to position 168 according to HxB2 Env; Fig. 1a). This substitution K168E was
109 previously shown as involved in resistance to PG9 and PG16 of a reference B strain (Walker
110 *et al.*, 2009). Analysis of complete Env sequences available from the Los Alamos database
111 (<http://www.hiv.lanl.gov>) showed that the presence of a glutamic acid at position 168 is
112 unusual, while a basic residue is found at this position in most of the sequences. Indeed,
113 among 111 CRF01_AE and 698 clade B sequences, respectively 100% (91.9% lysine, 8.1%
114 arginine) and 94.7% (84% lysine, 10.7% arginine) harbour a basic residue, whereas only 1.3%
115 of B sequences present a glutamic acid residue (Fig. 1b). Similarly, among sequences from
116 other subtypes, a basic residue is found in 99.1%, 99.1%, 100%, 96.3% and 100% of A, C, D,
117 F and G sequences, respectively. Recently, this basic residue was shown to directly interact
118 with PG9 in the reported structure of the V1V2 region of two clade C strains in complex with
119 this mAb (McLellan *et al.*, 2011).

To assess the impact of the substitution K168E in a non-B naturally occurring variant, we created two mutant *env* genes by site-directed mutagenesis. We introduced the substitution K168E in clone 0978-M2 (0978-M2 K168E) and the reverse substitution E168K in clone 0978-M3 (0978-M3 E168K) (Fig. 1c). We produced pseudotyped viruses and then determined the neutralizing activity of PG9 and PG16 toward these mutants. The substitution E168K in the resistant clone 0978-M3 (0978-M3 E168K) resulted in a high sensitivity to both PG9 (IC₅₀: 0.1 µg/mL) and PG16 (IC₅₀: 0.03 µg/mL). In contrast, the substitution K168E in the sensitive clone 0978-M2 (0978-M2 K168E) conferred resistance to both mAbs (IC₅₀ >10 µg/mL; Fig. 1c and 1d). Our results indicate that K168E had a major impact on PG9 and PG16 neutralization sensitivity, thus confirming in a non-B virus that an acidic residue or a basic residue at position 168 in the V2 loop is a key element determining the sensitivity to PG9 and PG16.

Substitution I215M confers neutralization resistance to PG9 and PG16

As presented above, we observed peculiar patterns of neutralization for clones from case 0858: clone 0858-M1 was sensitive to PG9 but resistant to PG16 whereas clone 0858-M2 was resistant to both mAbs (Table 1). The alignment of Env amino-acid sequences revealed that these two clones differed only by two substitutions located in two constant regions. Clone 0858-M1 had two isoleucine (I) at positions 215 (C2 region) and 475 (C5 region) whereas clone 0858-M2 had two methionine (M) at these positions (Fig. 2a). Analysis of sequences from the database indicated that 100% and 99.6% of sequences from CRF01_AE and B viruses harbour an isoleucine at position 215, whereas only 0.1% of B sequences had a M215, suggesting a high conservation of an isoleucine at this position (Fig. 2b). However, the conservation of an isoleucine at position 475 differed between the two subtypes. Indeed, 73% of CRF01_AE sequences harbour an isoleucine and 20.7% a methionine, whereas B

sequences harbour mostly a M475 (98.4%) and much less frequently a I475 (1.6%). Similarly, in sequences belonging to other subtypes, the isoleucine at position 215 is highly conserved, with 99.1% and 97.6 % of A and C sequences, respectively, and 100% of D, F and G sequences harbouring this residue, whereas the isoleucine at position 475 is less frequent, with only 3.4%, 0.03% and 2.4% of A, C and D sequences, respectively, and no F and G sequences containing this residue.

In order to analyze the contribution of each naturally occurring substitution (I215M and I475M) to the neutralization resistance of clone 0858-M2, we introduced the two reverse substitutions by site-directed mutagenesis in this clone (0858-M2 M215I and 0858-M2 M475I) (Fig. 2c). Although the neutralization profiles of clones derived from case 0858 presented an unusual profile with a shallow slope and plateaus at < 100%, a profile that was reported by others as linked to glycosylation at critical sites (Doores & Burton, 2010), we found clearly that the substitution M215I in clone 0858-M2 (0858-M2 M215I) conferred sensitivity to PG9 (IC_{50} : 0.71 μ g/mL) whereas the mutant 0858-M2 M475I remained highly resistant to PG9 (IC_{50} >10 μ g/mL; Fig. 2c and 2d). These results suggest that a methionine at position 215 in the C2 domain has a major impact on the resistance to PG9 in a CRF01_AE clone.

To further assess the impact of M215 in resistance to PG9 and PG16, we analyzed the sensitivity to both mAbs of a larger panel of Env-pseudotyped viruses derived from 4 additional CRF01_AE (0377-I1, 0978-M1, 0978-I3, 1021-I1) and 6 clade B clones (5008CL2, 5008CL3, 5008CL8, 6006CL6, 11005CL3 and 11005CL7) issued from previous studies (Braibant *et al.*, 2008; Chaillon *et al.*, 2011, Thenin *et al.*, 2012). All these clones harboured an isoleucine at position corresponding to 215 according to HxB2 Env numbering, and all were sensitive to both PG9 (IC_{50} range: 0.03 – 3.31 μ g/mL) and PG16 (IC_{50} range: 0.01 – 3.14 μ g/mL) (Fig. 3a, 3b and 3c). By site-directed mutagenesis, we introduced the substitution

I215M in all clones, and found that the I215M diminished the sensitivity of all clones to both PG9 and PG16, except that of clone 5008CL2 for PG9 (Fig. 3a and 3b). However, the magnitude of the effect appeared clearly clone-dependent illustrating the highly antigenic complexity of the HIV-1 glycoproteins (Fig. 3c). Collectively, both PG9 and PG16 IC₅₀ values were significantly lower for wild type clones than for their mutated I215M counterparts (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $P<0.01$ and $P=0.01$ for PG9 and PG16 IC₅₀ respectively, Fig. 3c).

Altogether these results indicate that a methionine at position 215 in the C2 domain has an impact on sensitivity to PG9 and PG16 in two distantly related HIV-1 clades. In addition to its contribution to the PG9/PG16 epitopes, the limited polymorphism across clades at this position might suggest that residue at position 215 contributes to a functional domain.

Substitution I215M did not impact the global neutralization phenotype

We next wanted to assess if substitution I215M affects the overall conformation of the envelope glycoproteins by measuring its impact on sensitivity to neutralization by a panel of neutralizing antibodies targeting different epitopes. Thus, we examined the sensitivity of both clade B and CRF01_AE clones to b12, a mAb targeting the CD4 binding region of gp120, and to 2F5 and 4E10 mAbs targeting the MPER of gp41. In addition, B clones were tested against 2G12 mAb recognizing a conformational glycan-dependent epitope on gp120. This last antibody was not used for the CRF01_AE clones since all of them lacked the N332 residue, which constitutes one of the essential N-glycosylation sites of the 2G12 epitope (Sanders *et al.*, 2002; Scanlan *et al.*, 2002). Contrary to what we observed for PG9 and PG16, the mutation I215M did not lead to systematic changes in sensitivity to neutralization by any of the antibodies tested (Fig. 4a, 4b and 4c). Concerning b12, the most resistant clones of each subtype (IC₅₀ >50 µg/mL) remained resistant and the most sensitive clones (IC₅₀ <10 µg/mL)

remained sensitive. Among the 11 tested clones, only 2 clade B clones, 5008CL3 and 5008CL8, displaying a moderate sensitivity to b12 were found more sensitive after introduction of substitution I215M (IC_{50} : 9.87 *versus* 0.32 $\mu\text{g/mL}$ and 6.13 *versus* 0.30 $\mu\text{g/mL}$ respectively). Collectively, the IC_{50} of b12 toward wild type or mutated clones were not significantly different (Wilcoxon matched-pairs signed rank test: $P=0.50$). Similarly, 2G12 sensitivity of B clones remained comparable ($P=0.25$), with only one resistant clone, 5008CL3, which became moderately sensitive ($IC_{50} >50 \mu\text{g/mL}$ *versus* 4.59 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 4b and 4c). Both wild type and mutated clones of each subtype were found highly sensitive to 2F5 (IC_{50} range: $<0.10 - 0.69 \mu\text{g/mL}$) and 4E10 (IC_{50} range: $<0.10 - 1.93 \mu\text{g/mL}$). A trend towards a higher resistance of mutated clones compared to wild type clones was nevertheless observed for 0377-I1, 0978-M1 and 1021-I1 CRF01-AE clones (Fig. 4a and 4c). However, the opposite was observed for 5008CL2, 11005CL3 and 11005CL7 clade B clones with a trend towards a higher sensitivity of the mutated counterparts (Fig. 4b and 4c). Collectively, comparing 2F5/4E10 IC_{50} toward wild type or mutated clones did not reveal any significant difference ($P=1.00$ and 0.32, for 2F5 and 4E10 IC_{50} respectively).

Together these results indicate that in contrast to what we observed for PG9 and PG16, a methionine or isoleucine residue at position 215 did not modulate the neutralisation sensitivity by other monoclonal antibodies, including antibodies targeting conformational-dependant epitopes on monomeric gp120. This suggested that the overall conformation of gp120 is not affected by the presence of a methionine at position 215.

Structure-function relationships

To try to understand the implication of M215 in resistance to PG9 and PG16, we modeled the three-dimensional structure of the gp120 from clone 0858-M2 in its monomeric and trimeric state. Because the V1V2 loop structure was not elucidated in known structures of

gp120, we used the recent X-ray data of the crystal structure of the V1V2 domain in complex with the antigen-binding fragment (Fab) of PG9 (McLellan *et al.*, 2011) to model the V1V2 region of clone 0858-M2, independently of its gp120 core. We then grafted the obtained V1V2 structure on a model of 0858-M2 gp120 core, to obtain a full monomeric model of 0858-M2 gp120. The trimeric model of 0858-M2 gp120 was reconstructed by superimposing three copies of the monomer onto the corresponding chains of a native gp120 trimer model in its unliganded state (Liu *et al.*, 2008). To locate the PG9/PG16 epitope on the gp120 trimer, we used an unliganded structure because previous studies have shown that both PG9 and PG16 binding to gp120 trimers is diminished by soluble CD4, suggesting that conformational changes induced by CD4 binding alters the epitope targeted by these antibodies (Walker *et al.*, 2009).

The obtained three-dimensional 0858-M2 gp120 trimer revealed that M215 was located at the surface of a gp120 monomer in close spatial proximity to the PG9 epitope of a neighboring monomer (Fig. 5). In the context of the gp120 trimer, we can therefore hypothesize that the nature of the residue at position 215 of a given monomer may stabilize or destabilize the binding of PG9/PG16 to the epitope of a neighboring monomer. This would be consistent with the fact that PG9/PG16 bind preferentially to the assembled trimeric spike ('quaternary epitope') over monomeric gp120. The M215 on a given monomer is also close to the stem of the V1V2 domain of the same monomer, a region known to be involved in conformational changes after CD4 receptor binding. It may therefore be possible that the nature of the residue at position 215, close to the stem of the V1V2 domain, could influence the ternary or quaternary conformation of gp120. An amino acid substitution at that position could then lead to local structural rearrangements and consequently could modify the conformation or exposure of PG9/PG16 epitope. A drastic effect on the ternary structure of gp120 seems unlikely to occur given the absence of any systematic effect of the mutation

M215I on neutralization by other neutralizing mAbs, including antibodies targeting conformational-dependant epitopes on monomeric gp120.

In conclusion, taking advantage of Env clones derived from closely-related natural variants circulating in HIV-1 infected patients, we demonstrated the implication of two cross-clade conserved residues in sensitivity to the broadly neutralizing mAbs PG9 and PG16. We confirm that an acidic residue or a basic residue at position 168 in the V2 loop is a key element determining the sensitivity to PG9 and PG16 (McLellan *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2009). In addition, we provide evidence of the involvement of a conserved residue at position 215 of the C2 region in the PG9/PG16 epitopes. Our study demonstrates that the screening of the sensitivity to mAbs neutralization of naturally occurring closely-related variants issued from a patient's viral quasispecies is a useful strategy that may provide relevant data, complementary to those obtained through analysis of the sensitivity to mAbs of libraries of artificial mutants of a reference laboratory strain.

Materials and methods

Study population

We selected samples from mother-infant pairs enrolled in the “Perinatal HIV Prevention Trial” cohort (Lallemant *et al.*, 2000), that were described in previous studies (Samleerat *et al.*, 2008; Thenin *et al.*, 2009), and samples from long-term nonprogressor patients (Braibant *et al.*, 2008; Chaillon *et al.*, 2011). Env clones corresponded to a 1.2 kb fragment of the VI-V5 region covering almost the entire HIV-1 *env* gp120 gene (from upstream V1 to downstream V5) previously cloned in pCR2.1 vector (Invitrogen). Accession numbers are indicated in Table 1 and Fig. 3.

Construction of chimeric *env* genes

In order to obtain complete gp160 *env*, we constructed chimeric *env* genes in a NL4.3 backbone as described previously (Braibant *et al.*, 2010). Briefly, the complete gp160 NL4.3 *env* gene was inserted into the *EcoRI* site of the pCR2.1 vector. Part of the *env* gene coding for V1 to V5 regions was extracted from this construct using *NdeI* and *MfeI* restriction (New England BioLabs) and replaced by the corresponding gp120 sequence of interest excised from the pCR2.1 vector by digestion with the same enzymes. Chimeric *env* genes containing each gp120 sequence inserted in the NL4.3 backbone were then subcloned into the *EcoRI* site of the pCI expression vector (Promega).

Generation of *env*-pseudotyped viruses

Env-pseudotyped viruses were generated as described previously (Samleerat *et al.*, 2009). 3.5×10^6 293T cells were cotransfected with 12 μ g of each pCI-*env* plasmid and 8 μ g of pNL4.3.LUC.R-E- (Connor *et al.*, 1995), using phosphate calcium (Invitrogen). Viral supernatants were collected 72 hours later, purified by filtration (0.45 μ m filter) and stored as aliquots at -80°C. Viral infectivity was monitored by infection of 1×10^4 TZM-bl cells with 100 μ l of serial 5-fold dilutions of the viral supernatants in quadruplicate in the presence of 30 μ g/mL of DEAE-dextran. Infection levels were determined after 48h, using the Bright Glo luciferase assay (Promega) and a Centro LB 960 luminometer (Berthold Technologies) to measure luciferase activity in cell lysates. Results with Relative Light Unit (RLU) values > 2.5 times the negative control (cells alone) were considered positive.

Neutralization and inhibition assay

Sensitivity to mAbs PG9, PG16, b12, 2G12, 2F5 and 4E10 were assessed in duplicate in TZM-bl cells. After titration, pseudotyped virus stocks were diluted to obtain 1000

TCID₅₀/mL in growth medium. Aliquots of 25µL were then incubated for 1h at 37°C with 75µL of either three-fold serial dilutions of PG9 and PG16 (10 µg/mL to 0.005 µg/mL; IAVI), or two-fold serial dilutions of b12, 2G12, 2F5 and 4E10 (50 µg/mL to 0.1 µg/mL; Polymun Scientific). Then 1x10⁴ TZM-bl cells were added to the virus/serum mixture in the presence of 30 µg/mL of DEAE-dextran. Luciferase activity was measured 48h after infection as described above. Results were expressed as mean values. IC₅₀ values were defined as the reciprocal of the serum dilution or antibody concentration required to reduce RLUs by 50%.

Site-directed mutagenesis

Substitution of glutamic acid amino acid to lysine at position 168 (E168K) and the reverse substitution K168E were introduced by site-directed mutagenesis in clones 0978-M3 and 0978-M2 respectively. A Glu (GAG) was changed to a Lys (AAG) in clone 0978-M3 (0978-M3 E168K), and inversely, a Lys (AAG) was changed to a Glu (GAG) in clone 0978-M2 (0978-M2 K168E). Substitutions of methionine to isoleucine were introduced in clone 0858-M2 at position 215 (0858-M2 M215I) and 475 (0858-M2 M475I) by changing ATG to ATC. The reverse substitution of isoleucine to methionine at position 215 (I215M) was introduced in six clade B and four clade CRF01_AE Env clones, by changing ATA to ATG. DNA fragments containing the desired mutation within pCR2.1 Env clones were amplified by PCR with Phusion High Fidelity DNA Polymerase (BioLabs), using two nonoverlapping 5'-phosphorylated primers. The PCR amplification conditions were one cycle at 98°C for 30s followed by 35 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 48 to 59°C according to primers, and 30 s at 72°C, and a final extension step of 72°C for 10 min. Following amplification, the DNA products were treated with the DpnI endonuclease to digest the parental DNA template. The DNA products were then purified and ligated to themselves by using T4 DNA ligase. The resulting mutated products were checked by sequencing.

Molecular modelling of gp120 monomer and trimer

A 3D model of the monomeric gp120 of 0858-M2 was built by comparative modeling using the SwissModel server at Expasy (www.expasy.ch) and a two-step procedure. First gp120 core including V3 loop was modelled based on the structure of the HIV-1 JR-FL gp120 core protein complexed with CD4 and the X5 antibody (2b4c PDB accession name). Second the V1/V2 loop of 0858-M2 was modeled independently based on the recently described X-ray structure of the V1/V2 domain of the CAP45 strain of HIV-1 complexed with neutralizing PG9 antibody (3u4e PDB code) (McLellan et al, Nature, 2011). The resulting V1/V2 loop was then grafted at the corresponding insertion points in the 0858-M2 gp120 core. The full gp120 monomer was then energy-minimized without any constraints by 500 steps of conjugate gradient algorithm using Discover (InsightII software, Accelrys Inc). Quality of the final model was evaluated using various tools including Anolea and Gromos, and found to be satisfactory. The trimer assembly of 0858-M2 gp120 was reconstructed by superimposing three copies of the 0858-M2 monomer onto the corresponding monomers of gp120 in their unliganded state of the HIV-1 gp120 trimer (HXB2R strain) (3dmn PDB code) using Pymol (www.pymol.org).

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites (ANRS, Paris, France). Suzie Thenin was a recipient of a doctoral fellowship from the ANRS, and from the Fonds de dotation Pierre Bergé - Sidaction. We sincerely thank Pascal Poignard and IAVI for providing us with the PG9 and PG16 mAbs. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4.3.LUC.R-E- from Dr. Nathaniel Landau; TZM-bl from Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun WU and Tranzyme Inc

References

- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., & other authors. (2000).** Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**, 200-206.
- Barouch, D. H. (2008).** Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* **455**, 613-619.
- Binley, J. M., Lybarger, E. A., Crooks, E. T., Seaman, M. S., Gray, E., Davis, K. L., Decker, J. M., Wycuff, D., Harris, L., & other authors. (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.
- Bonsignori, M., Hwang, K.-K., Chen, X., Tsao, C.-Y., Morris, L., Gray, E., Marshall, D. J., Crump, J. A., Kapiga, S. H., & other authors. (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.
- Braibant, M., Agut, H., Rouzioux, C., Costagliola, D., Autran, B. & Barin, F. (2008).** Characteristics of the env genes of HIV type 1 quasiespecies in long-term nonprogressors with broadly neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* **47**, 274-284.
- Braibant, M., Xie, J., Samri, A., Agut, H., Autran, B. & Barin, F. (2010).** Disease progression due to dual infection in an HLA-B57-positive asymptomatic long-term nonprogressor infected with a nef-defective HIV-1 strain. *Virology* **405**, 81-92.
- Burton, D. R., Desrosiers, R. C., Doms, R. W., Koff, W. C., Kwong, P. D., Moore, J. P., Nabel, G. J., Sodroski, J., Wilson, I. A. & Wyatt, R. T. (2004).** HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**, 233-236.
- Burton, D. R., Hessel, A. J., Keele, B. F., Klasse, P. J., Ketas, T. A., Moldt, B., Dunlop, D. C., Poignard, P., Doyle, L. A., & other authors. (2011).** Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 11181-11186.
- Chaillon, A., Braibant, M., Moreau, T., Thenin, S., Moreau, A., Autran, B. & Barin, F. (2011).** The V1V2 domain and a N-linked glycosylation site in the V3 loop of the HIV-1 envelope glycoprotein modulate neutralization sensitivity to the human broadly neutralizing antibody 2G12. *J Virol* **85**, 3642-3648.

Connor, R. I., Chen, B. K., Choe, S. & Landau, N. R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**, 935-944.

Corti, D., Langedijk, J. P. M., Hinz, A., Seaman, M. S., Vanzetta, F., Fernandez-Rodriguez, B. M., Silacci, C., Pinna, D., Jarrossay, D., & other authors. (2010). Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS ONE* **5**, e8805.

Doores, K. J. & Burton, D. R. (2010). Variable loop glycan dependency of the broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies PG9 and PG16. *J Virol* **84**, 10510-10521.

Hessell, A. J., Poignard, P., Hunter, M., Hangartner, L., Tehrani, D. M., Bleeker, W. K., Parren, P. W. H. I., Marx, P. A. & 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. & 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**, e1000433.

Hessell, A. J., Rakasz, E. G., Tehrani, D. M., Huber, M., Weisgrau, K. L., Landucci, G., Forthal, D. N., Koff, W. C., Poignard, P., & other authors. (2010). Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J Virol* **84**, 1302-1313.

Lallemant, M., Jourdain, G., Le Coeur, S., Kim, S., Koetsawang, S., Comeau, A. M., Phoolcharoen, W., Essex, M., McIntosh, K. & Vithayasai, V. (2000). A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators. *N Engl J Med* **343**, 982-991.

Li, Y., Migueles, S. A., Welcher, B., Svehla, K., Phogat, A., Louder, M. K., Wu, X., Shaw, G. M., Connors, M., & other authors. (2007). Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* **13**, 1032-1034.

Liu, J., Bartsaghi, A., Borgnia, M. J., Sapiro, G. & Subramaniam, S. (2008). Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **455**, 109-113.

Mascola, J. R., Lewis, M. G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T. C., Hayes, D., Louder, M. K., Brown, C. R., Sapan, C. V., & other authors. (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., & other authors. (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.

Mascola, J. R. (2003). Defining the protective antibody response for HIV-1. *Curr Mol Med* **3**, 209-216.

Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* **28**, 413-444.

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

Parren, P. W., Marx, P. A., Hessel, A. J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J. P. & 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.

Samleerat, T., Braibant, M., Jourdain, G., Moreau, A., Ngo-Giang-Huong, N., Leechanachai, P., Hemvuttiaphan, J., Hinjiranandana, T., Changchit, T., & other authors. (2008). Characteristics of HIV type 1 (HIV-1) glycoprotein 120 env sequences in mother-infant pairs infected with HIV-1 subtype CRF01_AE. *J Infect Dis* **198**, 868-876.

Samleerat, T., Thenin, S., Jourdain, G., Ngo-Giang-Huong, N., Moreau, A., Leechanachai, P., Ithisuknanth, J., Pagdi, K., Wannarit, P., & other authors. (2009). Maternal neutralizing antibodies against a CRF01_AE primary isolate are associated with a low rate of intrapartum HIV-1 transmission. *Virology* **387**, 388-394.

Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D. & Moore, J. P. (2002). The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**, 7293-7305.

Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Rudd, P. M. & Burton, D. R. (2002). The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**, 7306-7321.

Scheid, J. F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T. Y. K.,

Pietzsch, J., Fenyo, D., Abadir, A., & other authors. (2011). Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**, 1633-1637.

Thenin, S., Samleerat, T., Tavernier, E., Ngo-Giang-Huong, N., Jourdain, G., Lallemand, M., Barin, F. & Braibant, M. (2012). Envelope glycoproteins of Human Immunodeficiency Virus type 1 variants issued from mother-infant pairs display a wide spectrum of biological properties. *Virology*

Walker, L. M. & Burton, D. R. (2010). Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr Opin Immunol* **22**, 358-366.

Walker, L. M., Phogat, S. K., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J. L., Wrin, T., Simek, M. D., Fling, S., & other authors. (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285-289.

Walker, L. M., Simek, M. D., Priddy, F., Gach, J. S., Wagner, D., Zwick, M. B., Phogat, S. K., Poignard, P. & Burton, D. R. (2010). A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog* **6**, 1001028.

Walker, L. M., Huber, M., Doores, K. J., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J.-P., Wang, S.-K., Ramos, A., Chan-Hui, P.-Y., & other authors. (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466-470.

Wu, X., Yang, Z.-Y., Li, Y., Hogerkorp, C.-M., Schief, W. R., Seaman, M. S., Zhou, T., Schmidt, S. D., Wu, L., & other authors. (2010). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**, 856-861.

Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.-Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y. D., Scheid, J. F., Shi, W., & other authors. (2010). Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* **329**, 811-817.

Legend to the figures

Figure 1 : Substitution K168E confers neutralization resistance to PG9 and PG16. (a)

Alignment of amino-acid sequences from *env* clones of case 0978. Amino-acid numbering is based on HxB2 sequence. Identical amino acids are indicated by dots. (b) Representation of the frequencies of K168 residue within part of the V2 loop from CRF01_AE and B subtypes viruses using the WebLogo application (<http://weblogo.berkeley.edu>). The overall height of the stack indicates the sequence conservation at that position, while the height of symbols within the stack indicates the relative frequency of each amino acid at that position. (c) E168K and K168E substitutions were introduced by directed mutagenesis into the two parental clones 0978-M3 and 0978-M2, respectively. Effects of E168K and K168E substitution on PG9 and PG16 neutralization of pseudotyped viruses was analyzed in TZM-bl cells. The neutralization percentage is plotted against PG9 or PG16 concentrations ($\mu\text{g/ml}$); mutant clones are indicated by filled symbols. (d) Fifty percent neutralization titers ($\mu\text{g/mL}$) by PG9 and PG16 of parental and mutant pseudotyped viruses.

Figure 2 : Impact of I215M and I475M substitutions on PG9 neutralization in a

CRF01_AE clone. (a) Alignment of amino-acid sequences from *env* clones of case 0858.

Amino-acid numbering is based on HxB2 sequence. Identical amino acids are indicated by dots. (b) Representation of the frequencies of I215 and I475 residues from CRF01_AE and B subtypes viruses using WebLogo as described in Fig 1. (c) Reverse M215I and M475I substitutions were introduced by site-directed mutagenesis into the parental clone 0858-C2. Effects of M215I and M475I substitution on PG9 neutralization of pseudotyped viruses was analysed in TZM-bl cells. The neutralization percentage is plotted against PG9 concentrations ($\mu\text{g/ml}$); mutant clones are indicated by black and grey filled symbols. (d) Fifty percent neutralization titers ($\mu\text{g/mL}$) by PG9 of parental and mutant pseudotyped viruses.

Figure 3 : Impact of I215M substitution on PG9 and PG16 neutralization in four CRF01-AE and six clade B Env-pseudotyped viruses. (a-b) I215M substitution was introduced by site-directed mutagenesis into four CRF01-AE (a) and six clade B (b) parental clones. Effects of I215M substitution on PG9 and PG16 neutralization of pseudotyped viruses was analysed in TZM-bl cells. The neutralization percentage is plotted against PG9 or PG16 concentrations ($\mu\text{g/ml}$); dashed lines show neutralization curves of mutated clones. (c) Fifty percent neutralization titers ($\mu\text{g/mL}$) by PG9 and PG16 of parental and mutant pseudotyped viruses. (d) Comparisons of fifty percent neutralization titers by PG9 and PG16 between parental and mutated clones. The horizontal bars indicate the median 50% neutralization titers. Comparisons were done using a Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Figure 4 : Impact of I215M substitution on b12, 2G12, 2F5 and 4E10 neutralization. (a) Effects of I215M substitution on b12, 2F5 and 4E10 neutralization in four CRF01-AE clones and effect of the reverted substitution M215I in CRF01-AE 0858-M2 clone was analysed in TZM-bl cells. The neutralization percentage is plotted against mAb concentrations ($\mu\text{g/ml}$); dashed lines show neutralization curves of mutated clones. (b) Effects of I215M substitution on 2G12, b12, 2F5 and 4E10 neutralization in six clade B clones was analysed in TZM-bl cells. The neutralization percentage is plotted against mAb concentrations ($\mu\text{g/ml}$); dashed lines show neutralization curves of mutated clones. (c) Fifty percent neutralization titers ($\mu\text{g/mL}$) by b12, 2G12, 2F5 and 4E10 of parental and mutant pseudotyped viruses.

Figure 5 : Three-dimensional models of the 0858-M2 gp120 monomer and trimer. (a) Ribbon diagram of the 0858-M2 gp120 monomer showing the location of Met 215 (blue) at the base of the bridging sheet, a residue which confers resistance of 0858-M2 strain to neutralization by PG9 antibody. The V1/V2 and V3 loop are coloured pale yellow and pale

orange respectively. The solvent-accessible molecular surface of gp120 is also shown with semi-transparent rendering. (b) and (c) Model of the trimer assembly of the 0858-M2 gp120 depicted with its molecular surface. Asparagine 156 and asparagine 160 which bear the glycan chains forming the major part of the V1/V2 epitope involved in PG9 binding are also shown in green for the front gp120 monomer. Interestingly, Met 215 of the next neighbour monomer appears to be in close spatial vicinity to the PG9 epitope region. In panel C, the trimer was rotated by 90 ° around the X-axis. The figure was prepared with Pymol (<http://www.pymol.org>).

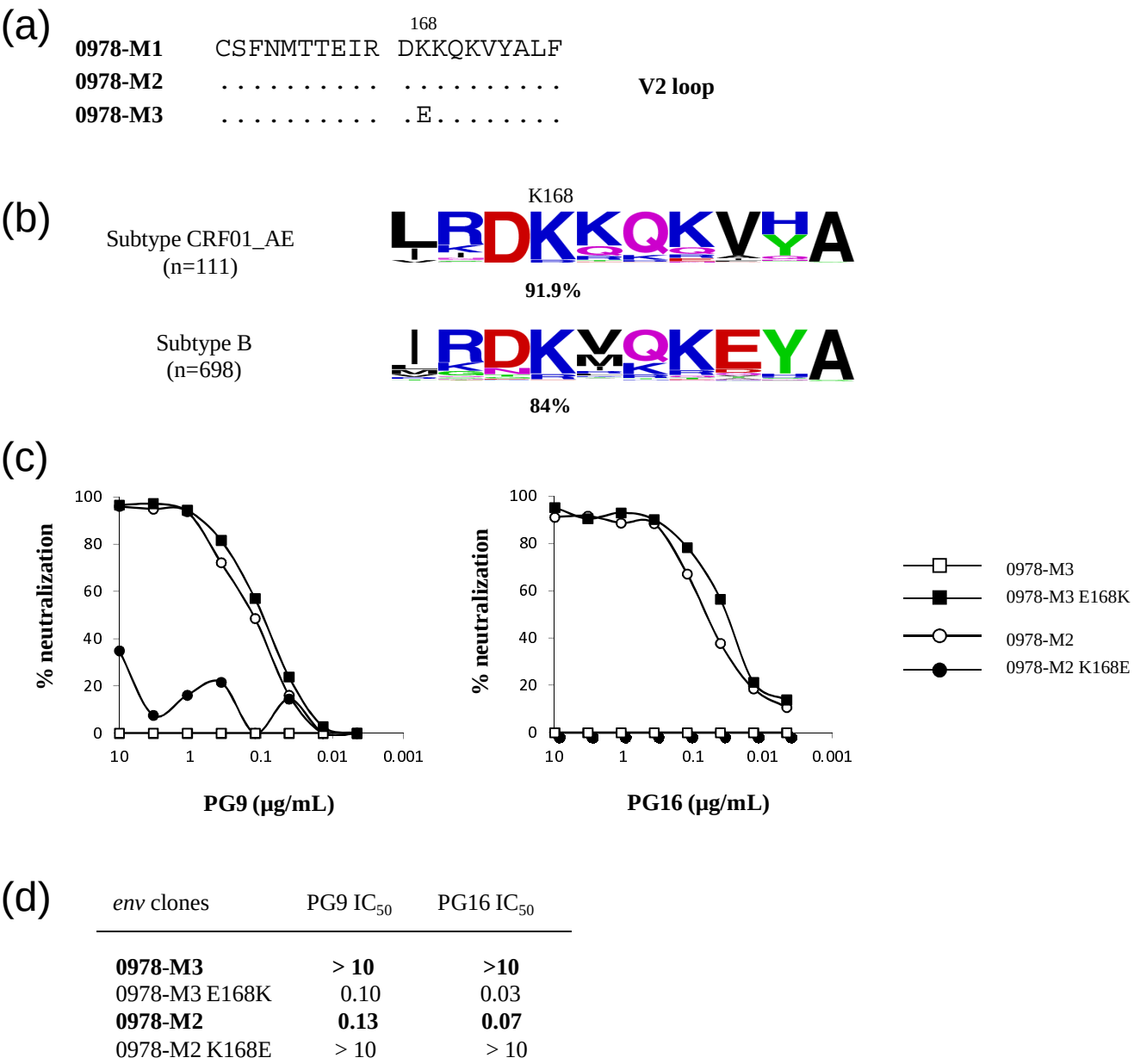
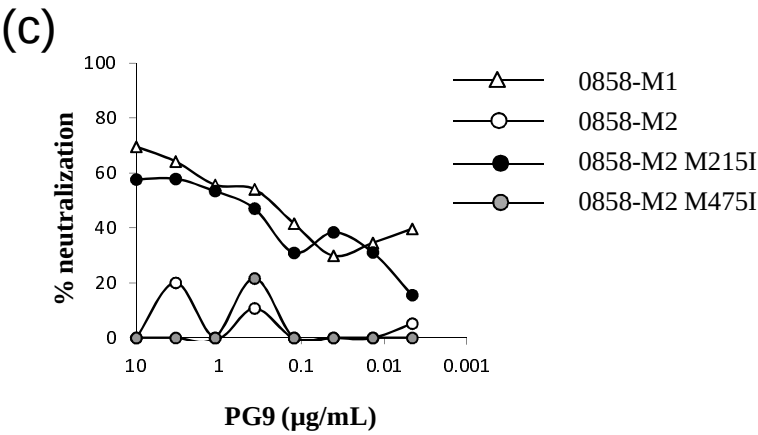
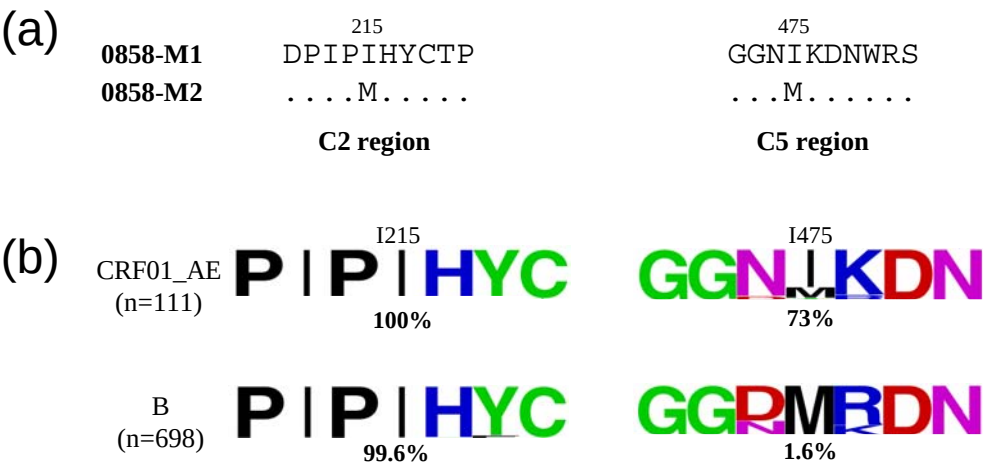


Fig. 1: Thenin et al

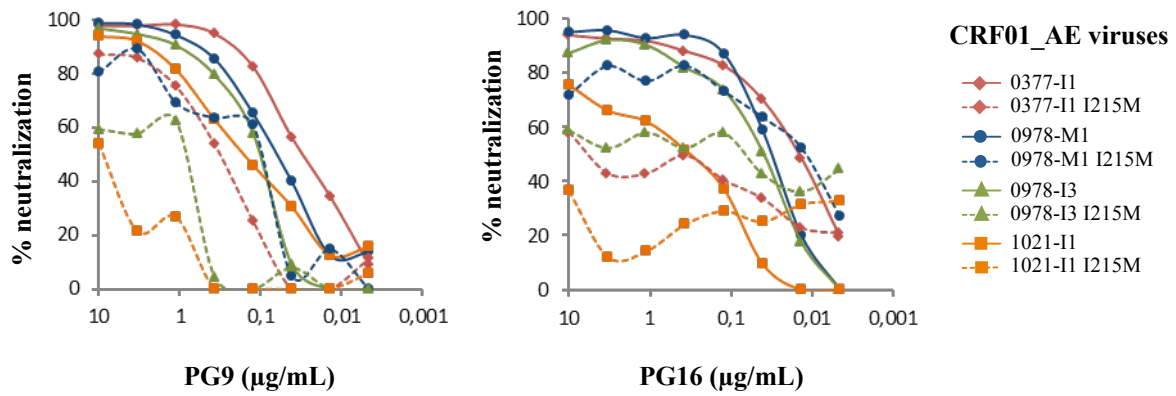


D.

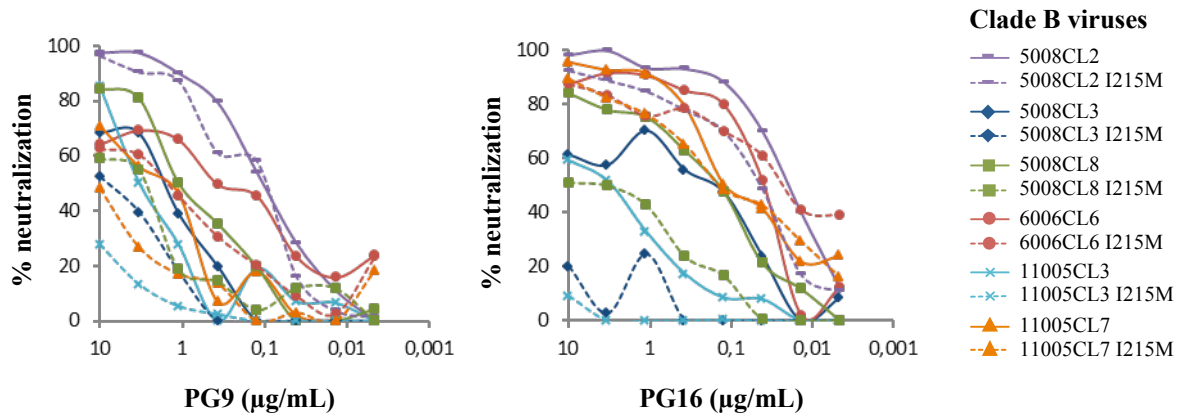
<i>env</i> clones	PG9 IC ₅₀
0858-M1	0.29
0858-M2	> 10
0858-M2 M215I	0.71
0858-M2 M475I	> 10

Fig 2: Thenin et al.

(a)



(b)



(c)

env clones (Genbank ID)	Subtype	PG9 IC ₅₀	PG16 IC ₅₀
0377-I1 (JQ003579)	CRF01_AE	0.03	0.01
0377-I1 I215M	CRF01_AE	0.34	6.45
0978-M1 (HQ875346)	CRF01_AE	0.07	0.03
0978-M1 I215M	CRF01_AE	0.10	0.01
0978-I3 (EU031130)	CRF01_AE	0.11	0.04
0978-I3 I215M	CRF01_AE	0.95	0.08
1021-I1 (EU031153)	CRF01_AE	0.18	0.34
1021-I1 I215M	CRF01_AE	9.20	> 10
5008CL2 (EF179925)	B	0.11	0.02
5008CL2 I215M	B	0.10	0.05
5008CL3 (EF179926)	B	1.94	0.20
5008CL3 I215M	B	8.71	> 10
5008CL8 (EF179931)	B	1.11	0.16
5008CL8 I215M	B	3.04	4.44
6006CL6 (EU214591)	B	0.39	0.04
6006CL6 I215M	B	1.78	0.02
11005CL3 (EF179966)	B	3.31	3.14
11005CL3 I215M	B	> 10	> 10
11005CL7 (EF179970)	B	1.96	0.12
11005CL7 I215M	B	> 10	0.15

(d)

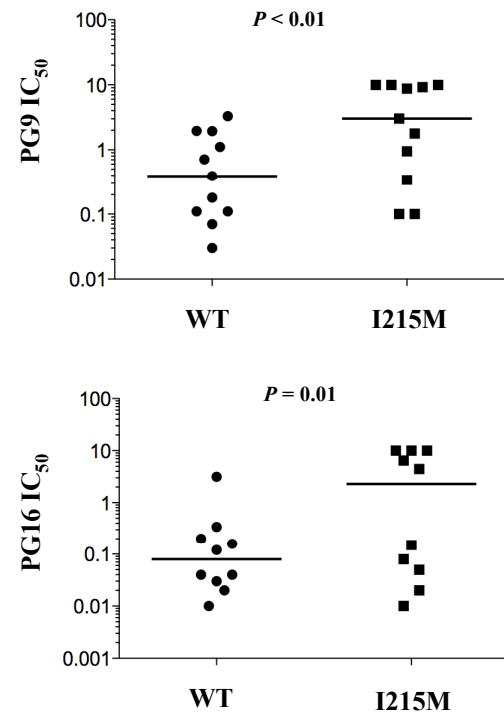
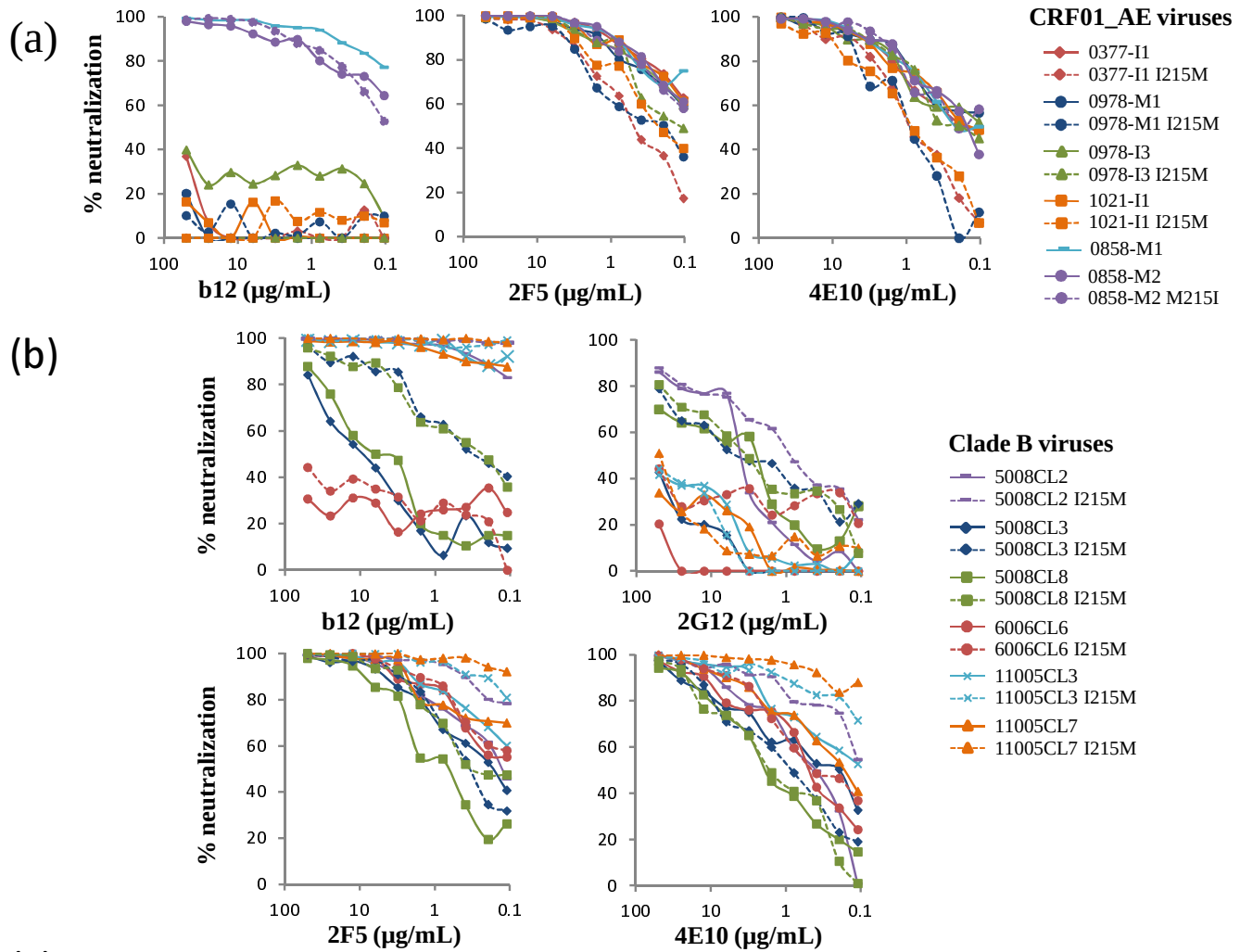


Fig. 3: Thenin et al



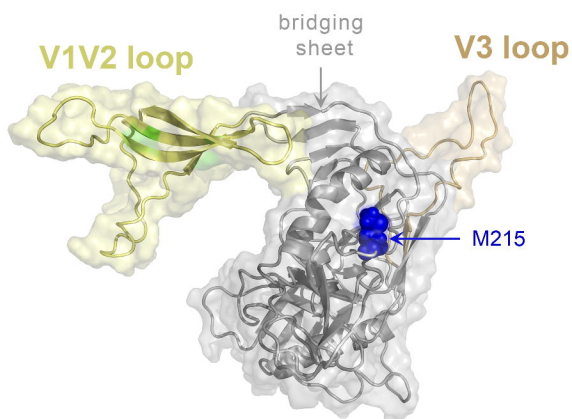
(c)

env clones	subtype	b12 IC ₅₀	2F5 IC ₅₀	4E10 IC ₅₀	2G12 IC ₅₀
0377-I1	CRF01_AE	>50	< 0.10	0.15	NA
0377-I1 I215M	CRF01_AE	>50	0.51	0.93	NA
0978-M1	CRF01_AE	>50	< 0.10	< 0.10	NA
0978-M1 I215M	CRF01_AE	>50	0.20	0.93	NA
0978-I3	CRF01_AE	>50	< 0.10	< 0.10	NA
0978-I3 I215M	CRF01_AE	>50	0.12	0.19	NA
1021-I1	CRF01_AE	>50	< 0.10	0.12	NA
1021-I1 I215M	CRF01_AE	>50	0.25	0.85	NA
0858-M1	CRF01_AE	< 0.10	< 0.10	0.21	NA
0858-M2	CRF01_AE	< 0.10	< 0.10	0.16	NA
0858-M2 M215I	CRF01_AE	< 0.10	< 0.10	0.20	NA
5008CL2	B	< 0.10	0.13	0.40	4.30
5008CL2 I215M	B	< 0.10	< 0.10	< 0.10	0.92
5008CL3	B	9.87	0.18	0.20	> 50
5008CL3 I215M	B	0.32	0.35	0.86	4.59
5008CL8	B	6.13	0.69	1.93	2.69
5008CL8 I215M	B	0.30	0.31	1.66	3.51
6006CL6	B	> 50	< 0.10	0.51	> 50
6006CL6 I215M	B	> 50	< 0.10	0.44	> 50
11005CL3	B	< 0.10	< 0.10	< 0.10	> 50
11005CL3 I215M	B	< 0.10	< 0.10	< 0.10	> 50
11005CL7	B	< 0.10	< 0.10	0.17	> 50
11005CL7 I215M	B	< 0.10	< 0.10	< 0.10	49,01

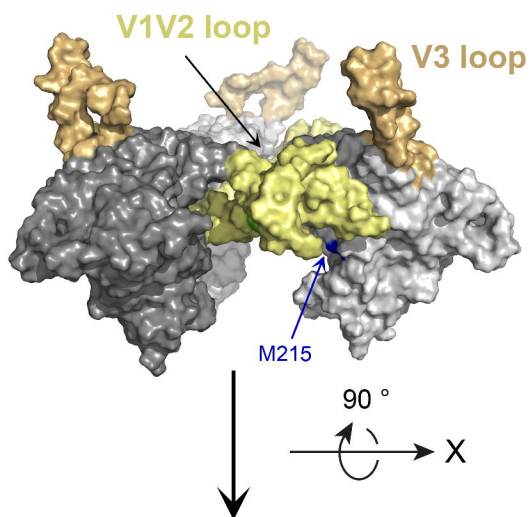
NA : Not applicable

Fig. 4: Thenin et al.

(a)



(b)



(c)

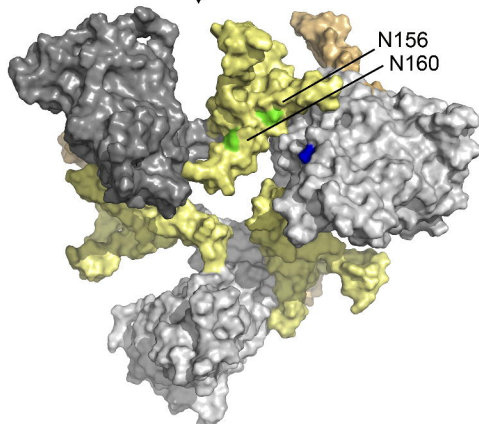


Fig. 5: Thenin et al.

Table 1. Sensitivity to PG9 and PG16 of naturally occurring *env* clones issued from three women infected by CRF01_AE variants.

Case	<i>env</i> clones (Genbank ID)	PG9 IC ₅₀ *	PG16 IC ₅₀ *
0377	0377-M1 (EU031223)	>10	>10
	0377-M2 (HQ875343)	0.31	1.98
	0377-M3 (EU031226)	1.46	3.31
	0377-M4 (EU031227)	2.43	7.58
	0377-M5 (HQ875344)	>10	>10
0858	0858-M1 (EU031374)	0.29	>10
	0858-M2 (HQ875345)	>10	>10
0978	0978-M1 (HQ875346)	0.07	0.03
	0978-M2 (EU031126)	0.13	0.07
	0978-M3 (HQ874347)	>10	>10

* µg/mL

Résultats et discussion

La transmission mère-enfant est la principale cause d'infection à VIH-1 chez l'enfant. Un certain nombre d'études ont montré que la population virale de l'enfant est restreinte et homogène génétiquement par rapport à la population virale maternelle, suggérant la présence d'une pression de sélection qui aboutit à la transmission d'un nombre limité de variants maternels pour l'établissement d'une nouvelle infection chez l'enfant (Ahmad *et al.*, 1995; Dickover *et al.*, 2001; Kishko *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011; Samleerat *et al.*, 2008; Scarlatti *et al.*, 1993a; Verhofstede *et al.*, 2003; Wolinsky *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2010a). Les anticorps neutralisants maternels sont parmi les facteurs de sélection potentiellement responsables de ce goulet d'étranglement. La transmission mère-enfant constitue ainsi un modèle naturel permettant d'étudier le rôle des anticorps passifs présents chez l'enfant avant une exposition au virus, et donc leur rôle dans la protection vis-à-vis de l'infection à VIH. Dans ce contexte, certaines études ont montré que la présence ou des titres élevés en anticorps neutralisants étaient associés à un risque plus faible de transmission mère-enfant du VIH-1. Cependant des résultats contradictoires ont été obtenus, liés en grande partie à la méthodologie (Barin *et al.*, 2006; Bongertz *et al.*, 2001; Bongertz *et al.*, 2002; Guevara *et al.*, 2002; Hengel *et al.*, 1998; Husson *et al.*, 1995; Lathey *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2011a; Russell *et al.*, 2011; Scarlatti *et al.*, 1993b). Alors qu'il avait été montré de manière convaincante que les virus transmis à l'enfant étaient en général des variants résistants à la neutralisation par les anticorps maternels (Dickover *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010b), deux études plus récentes n'ont pas observé de différence dans la sensibilité à la neutralisation par les anticorps maternels entre les virus transmis et les virus maternels (Kishko *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011). Les données concernant la neutralisation sont donc contradictoires et, à ce jour, très peu d'études se sont penchées sur les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des virus transmis de la mère à l'enfant.

Du fait de la restriction de la population virale transmise à l'enfant et de sa possible résistance à la neutralisation autologue, notre équipe avait émis l'hypothèse dans une étude antérieure que des anticorps neutralisants hétérologues de large spectre seraient susceptibles de protéger l'enfant de la transmission intrapartum du VIH-1. Cette étude, menée sur une population thaïlandaise, n'avait pas confirmé cette hypothèse mais avait mis en évidence que la présence

ou des titres élevés en anticorps neutralisant un isolat primaire hétérologue de sous-type CRF01_AE, MBA, étaient associés à un faible taux de transmission intrapartum du VIH-1 (Barin *et al.*, 2006). Afin de confirmer l'association observée, nous avons réalisé une étude complémentaire sur une population thaïlandaise plus large avec des critères de sélection particulièrement stringents, composée de 45 mères « transmetteuses » et 45 mères « non transmetteuses » appariées sur les deux principaux facteurs associés à la transmission mère-enfant, la charge virale et la durée du traitement préventif. Pour cela, nous avons comparé les titres en anticorps neutralisants dirigés contre 6 isolats primaires hétérologues (3 isolats de sous-type B et 3 isolats de sous-type CRF01_AE : C1712, LEA et MBA) dans les sérums des mères transmettant ou non le virus à leur enfant. Comme dans l'étude antérieure, nous avons mis en évidence que des titres élevés en anticorps neutralisant MBA étaient associés à un faible taux de transmission intrapartum du VIH-1. Par contre, aucune association n'a été trouvée pour les 2 autres virus de sous-type CRF01_AE et les 3 virus de sous-type B. Par ailleurs, nous avons également constaté que MBA était plus résistant à la neutralisation que les 2 autres virus C1712 et LEA, les 3 isolats de sous-type B présentant, quant à eux, un profil de neutralisation similaire.

Mon travail de thèse a donc consisté à rechercher si la protéine d'enveloppe de l'isolat MBA présentait une ou des caractéristiques moléculaires pouvant expliquer l'association observée uniquement avec cet isolat, ainsi que la résistance à la neutralisation de ce virus. Pour cela, nous avons amplifié, cloné et séquencé les gènes *env* des 3 souches de sous-type CRF01_AE. Par comparaison des séquences protéiques d'enveloppe, nous avons mis en évidence une différence majeure entre l'enveloppe du virus MBA et les enveloppes des 2 autres virus C1712 et LEA. En effet, l'enveloppe MBA possédait une région variable V2 exceptionnellement longue de 63 acides aminés (*versus* 38 et 40 acides aminés pour les virus C1712 et LEA) et fortement glycosylée avec 6 sites potentiels de N-glycosylation (PNGS) (*versus* 2 PNGS pour les virus C1712 et LEA). Une recherche d'homologie entre l'enveloppe MBA et les séquences présentes dans la database de Los Alamos a révélé que cette boucle variable V2 allongée était unique.

Des travaux ayant montré que le domaine variable V1/V2 pouvait influencer fortement la sensibilité à la neutralisation en masquant des épitopes neutralisants (Rong *et al.*, 2007 ; Pinter *et al.*, 2004 ; Sagar *et al.*, 2006 ; Shibata *et al.*, 2007 ; Wolk *et al.*, 2006), nous avons émis l'hypothèse que cette longue boucle variable V2 pourrait contribuer à la résistance à la

neutralisation du virus MBA. Afin de tester cette hypothèse, nous avons construit deux enveloppes chimères en intervertissant les domaines V2 des enveloppes LEA et MBA (V2LEA-*env*ΔV2MBA et V2MBA-*env*ΔV2LEA), puis nous avons produit les virus pseudotypés correspondants. Afin de démontrer le rôle potentiel du domaine V2 de MBA dans la résistance à la neutralisation de ce virus, nous avons comparé les profils de neutralisation par 10 sérums de mères de virus pseudotypés porteurs des enveloppes parentales LEA ou MBA ou de l'enveloppe chimère composée du long domaine V2 de MBA dans le squelette d'enveloppe de LEA (V2MBA-*env*ΔV2LEA). Les sérums de mères avaient été sélectionnés selon qu'ils neutralisaient de façon plus efficace LEA que MBA. Le domaine V2 de MBA a conféré à LEA un niveau de résistance plus élevé pour seulement 6 des 10 sérums testés, suggérant que la région V2 de MBA est bien impliquée dans la résistance à la neutralisation de ce virus par certains sérums, mais que d'autres déterminants moléculaires restant à identifier seraient associés à la résistance à la neutralisation par d'autres sérums. Nos données sont donc en accord avec les études précédemment citées sur le rôle du domaine V1/V2 dans la sensibilité à la neutralisation (Rong *et al.*, 2007 ; Pinter *et al.*, 2004 ; Sagar *et al.*, 2006 ; Shibata *et al.*, 2007 ; Wolk *et al.*, 2006). Depuis, d'autres études ont confirmé l'impact de ce domaine dans l'échappement aux anticorps neutralisants en démontrant qu'une augmentation de la longueur et/ou du nombre de PNGS dans la région variable V1/V2 entraînaient une résistance à la neutralisation (Moore *et al.*, 2009a ; Rong *et al.*, 2009 ; van Gils *et al.*, 2011a).

Les résultats de cette étude suggèreraient que les anticorps impliqués dans la diminution de la transmission mère-enfant cibleraient soit des épitopes exposés sur le long domaine V2 lui-même, soit des épitopes éloignés exposés par une conformation particulière imposée par cette longue région fortement glycosylée. De façon intéressante, Pinter *et al.* ont montré que le domaine V1/V2 est un régulateur global de la sensibilité à la neutralisation d'isolats primaires par des anticorps induits lors de l'infection, mais pas par les anticorps monoclonaux 2G12, b12 et 2F5 (Pinter *et al.*, 2004). Plusieurs études ont mis en évidence que le domaine V1/V2 représentait une cible des anticorps neutralisants (Gray *et al.*, 2007a, 2011b ; Lynch *et al.*, 2011b ; Moore *et al.*, 2008, 2009a, 2011 ; Pinter *et al.*, 2005 ; Rong *et al.*, 2007 ; Tomaras *et al.*, 2011 ; Walker *et al.*, 2010). Un certain nombre d'études ont entrepris d'explorer la spécificité des anticorps neutralisants contenus dans les sérums largement neutralisants d'individus infectés, en utilisant des techniques d'adsorption de sérum sur des protéines

d'enveloppes gp120 couplées à des billes. De façon surprenante, l'activité neutralisante de large spectre n'était pas adsorbée suggérant que ces anticorps ne reconnaîtraient pas des épitopes présents sur la gp120 monomérique mais des épitopes quaternaires dépendant de la structure trimérique des glycoprotéines d'enveloppes. Une analyse fine de la spécificité de ces anticorps a révélé qu'ils étaient dirigés contre des résidus localisés principalement dans les boucles variables V1/V2 et présentaient une activité neutralisante de type PG9/PG16 (Gray *et al.*, 2011b ; Moore *et al.*, 2011 ; Tomaras *et al.*, 2011 ; Walker *et al.*, 2010). Ces anticorps monoclonaux ciblent un épitope quaternaire constitué des régions conservées des boucles V1/V2 et V3 (Walker *et al.*, 2009). Ces données renforcent le rôle du domaine V1/V2 comme cible des anticorps neutralisants.

En conclusion, cette étude nous a permis de confirmer que des titres élevés en anticorps neutralisants dirigés contre l'isolat primaire de sous-type CRF01_AE, MBA, étaient associés à un faible taux de transmission intrapartum du VIH-1 en Thaïlande, et que la boucle V2 de la gp120 est fortement impliquée dans la neutralisation virale.

Une analyse moléculaire des virus transmis de la mère à l'enfant avait été réalisée également antérieurement au sein de notre laboratoire (Samleerat *et al.*, 2008). Les séquences de 353 gènes *env* (région V1-V5 de la gp120) de virus de sous-type CRF01_AE infectant 17 couples mère-enfant avaient été obtenues et analysées. Cette étude avait confirmé que la population virale transmise à l'enfant est, dans la plupart des cas, très restreinte génétiquement lorsque comparée à la population virale maternelle, témoignant d'un très probable avantage sélectif. L'une des constatations majeures était que deux PNGS, N301 localisé à la base de la boucle V3 et N384 localisé dans le domaine constant C3, étaient retrouvés systématiquement dans tous les clones des virus de nouveau-nés mais irrégulièrement dans les clones de virus maternels au sein de couples mère-enfant, suggérant qu'ils pourraient conférer un avantage sélectif aux virus transmis (Samleerat *et al.*, 2008). Mon travail de thèse a donc consisté à explorer les propriétés biologiques de virus pseudotypés porteurs d'enveloppes de clones maternels et de clones transmis à l'enfant issus de 4 couples mère-enfant (0377, 0858, 0978, 1021) provenant de l'étude moléculaire réalisée antérieurement.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné 37 clones représentatifs de la diversité des variants présents chez les mères et leurs enfants, et selon qu'ils possédaient ou non le ou les PNGS N301 et N384. Nous avons ensuite construit des gènes d'enveloppe chimères en insérant les gènes *env* (région V1-V5 de la gp120) des clones sélectionnés dans le squelette d'enveloppe de la souche NL4.3 et produit les virus pseudotypés correspondants. Sur les 37 virus pseudotypés produits, 17 étaient infectieux : 6 virus appartenant à la paire 0377 (5 clones de la mère et 1 clone de l'enfant), 6 virus à la paire 0978 (3 clones de la mère et 3 clones de l'enfant), 3 virus à la paire 1021 (1 clone de la mère et 2 clones de l'enfant) et 2 virus à la paire 0858 (2 clones de la mère). Dans un second temps, nous avons étudié les propriétés antigéniques et fonctionnelles des 17 virus pseudotypés infectieux. Nous avons donc déterminé et comparé leur sensibilité à la neutralisation autologue vis-à-vis des sérums maternels collectés avant l'instauration du traitement préventif (ZDV), la sensibilité à la neutralisation hétérologue vis-à-vis d'un pool de 10 sérums largement neutralisants hétérologues identifiés lors de l'étude antérieure (Samleerat *et al.*, 2009), ainsi que la sensibilité à la neutralisation par les anticorps monoclonaux humains largement neutralisants b12, PG9 et PG16.

Aucune différence significative dans la sensibilité à la neutralisation autologue n'a été observée entre les variants maternels et les variants transmis à l'enfant. Ces données vont à l'encontre d'études qui avaient montré que les variants transmis à l'enfant étaient en général des variants résistants à la neutralisation par les anticorps maternels autologues (Dickover *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2010a), mais confirment les résultats récents de l'étude de Kishko *et al.* dans laquelle aucune différence dans la sensibilité à la neutralisation par les anticorps maternels autologues entre les variants maternels et les variants transmis aux enfants n'a été observée au sein de 5 paires mère-enfant infectées par des virus de sous-type B (Kishko *et al.*, 2011). De plus, la présence d'un clone très sensible à la neutralisation par les anticorps maternels chez l'enfant de la paire 0978 de notre étude suggère un faible impact des anticorps maternels dans la sélection des variants transmis. Cette observation est en accord avec des études récentes qui suggèrent que la restriction de la population observée lors de la transmission verticale ne serait pas due à la sélection de variants de la population virale maternelle résistants à la neutralisation (Kishko *et al.*, 2011 ; Russell *et al.*, 2011).

Aucune différence significative dans la sensibilité à la neutralisation hétérologue n'a été observée entre les variants issus des nouveau-nés et les variants issus des mères, les 17 clones

que nous avons étudié présentant une forte sensibilité à la neutralisation par les anticorps hétérologues.

Nous avons également comparé la sensibilité à la neutralisation par trois anticorps monoclonaux humains largement neutralisants b12, PG9 et PG16. Nous n'avons pas observé de différence dans la sensibilité à b12, la majorité des clones étant résistants à la neutralisation par cet anticorps. Par contre nous avons observé que les virus transmis aux enfants étaient significativement plus sensibles à la neutralisation par PG9 et PG16 que les variants maternels. Cette donnée nouvelle pourrait indiquer que les variants sensibles à PG9 et PG16 possèderaient des propriétés fonctionnelles qui leur conféreraient un avantage sélectif lors de la transmission mère-enfant. Si ces données venaient à être confirmées dans une population plus large, les anticorps PG9 et/ou PG16 pourraient être intéressants pour une immunoprophylaxie dans le cadre de la transmission mère-enfant du VIH-1. D'autres études ont étudié la sensibilité à la neutralisation par divers anticorps monoclonaux largement neutralisants, b12, 2G12, 4E10 et 2F5, de clones d'enveloppe de VIH-1 provenant d'enfants infectés par des virus de sous-type B ou C (Gray *et al.*, 2006 ; Kishko *et al.*, 2011 ; Russell *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2006). Une étude, menée en vue d'une possible utilisation des anticorps monoclonaux en immunoprophylaxie de la transmission mère-enfant en Afrique du Sud, a analysé la sensibilité de 7 clones d'enfants infectés par des virus de sous-type C vis-à-vis des anticorps monoclonaux b12, 2G12, 2F5 et 4E10 (Gray *et al.*, 2006). Les données obtenues ont mis en évidence que seul l'anticorps 4E10 possédait une activité neutralisante contre des isolats du VIH-1 de sous-type C, alors que les anticorps 2F5, 2G12 et b12 ne sont pas ou partiellement efficaces. Les anticorps 2F5 et 2G12 ne seraient donc pas recommandés en cas d'immunisation passive dans le cadre de la transmission mère-enfant en Afrique du Sud (Gray *et al.*, 2006).

Nous avons également analysé les propriétés fonctionnelles des 17 virus pseudotypés. Pour cela, nous avons déterminé le tropisme viral en utilisant la lignée cellulaire U373-MAGI (cellules exprimant le récepteur CD4 associé au corécepteur CCR5 ou CXCR4), la sensibilité à deux inhibiteurs d'entrée, le CD4 soluble (CD4s) et un antagoniste du CCR5, le TAK-779, l'infectivité virale ainsi que le clivage et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppes par western-blot après électrophorèse en conditions dénaturantes et natives.

Tous les virus possédaient un tropisme R5 et présentaient une sensibilité homogène au TAK-779, sans différence significative entre les variants issus des mères et les variants issus des

enfants. La sensibilité au CD4s était très hétérogène au sein des 4 paires mère-enfant, mais aucune différence significative n'a été observée entre les variants maternels et ceux transmis aux enfants. Ces données sont en accord avec l'étude de Kishko *et al.* dans laquelle les clones d'enfants et de mères présentaient une sensibilité hétérogène au CD4s, sans différence entre les clones maternels et ceux des enfants (Kishko *et al.*, 2011).

L'étude de l'infectivité virale, basée sur un cycle unique d'infection, a été menée sur cellules TZM-bl et PBMC. Malgré une forte variabilité de l'infectivité au sein de chaque paire mère-enfant, nous n'avons pas observé de différence significative entre les variants des mères et ceux des enfants. Etant donné que nous avons travaillé avec des virus pseudotypés réalisant un unique cycle d'infection, nous n'avons pas été en mesure de comparer leur capacité répllicative et nous ne pouvons donc pas exclure une meilleure capacité répllicative des virus transmis. Des études menées sur des paires mère-enfant infectées par des virus de sous-type C avaient en effet montré une meilleure capacité répllicative des virus transmis comparé aux virus non-transmis et ce malgré une absence de différence dans leurs niveaux d'infectivité (Kwong *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2010b).

Nous avons également comparé le clivage et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppes dans les virions extracellulaires purifiés et n'avons pas observé de différence entre les clones issus des enfants et les clones maternels, malgré une grande hétérogénéité de ces propriétés au sein de la population étudiée. Ces données nous ont permis de mettre en évidence des corrélations entre le taux d'incorporation des trimères d'enveloppe et l'infectivité virale ainsi qu'entre la sensibilité au CD4s et l'infectivité virale. Les virus les plus infectieux étaient ceux qui présentaient des taux élevés d'incorporation des trimères, mais également ceux qui étaient les plus résistants au CD4s.

Dans l'étude réalisée antérieurement au laboratoire, il avait été observé une forte conservation de deux PNGS au sein des virus d'enfants, l'un en position N301 dans la boucle V3, et l'autre en position N384 dans le domaine constant C3, ce qui avait fait suggérer que ces deux PNGS pourraient conférer un avantage sélectif aux virus transmis aux enfants (Samleerat *et al.*, 2008). Nous avons comparé les propriétés antigéniques et fonctionnelles des 17 virus pseudotypés selon qu'ils possédaient ou non le ou les PNGS N301 et N384. Malgré le faible nombre de virus pseudotypés fonctionnels obtenus, nous avons pu mettre en évidence que la présence du PNGS N301 en présence ou non du PNGS N384 confère une résistance plus élevée à la neutralisation autologue, les clones N301⁺ N384⁻ et N301⁺ N384⁺ étant plus résistants à la neutralisation que les clones N301⁻ N384⁺ et N301⁻ N384⁻. Ces données sont en

accord avec des études qui avaient montré *in vitro* que le PNGS N301 était associé à une résistance plus importante à la neutralisation par des anticorps anti-CD4BS (Koch *et al.*, 2003 ; Malenbaum *et al.*, 2000).

En conclusion, notre étude a mis en évidence que les virus transmis à l'enfant ainsi que les variants présents chez leurs mères chroniquement infectées présentaient une très grande hétérogénéité des propriétés biologiques, et ce malgré la présence d'une population virale génétiquement restreinte chez les enfants. Ni le clivage et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les virions, ni le niveau d'infectivité et la sensibilité au CD4s et au TAK-779 ne sont associés à la transmission. Nous n'avons donc pas identifié de caractéristiques moléculaires conférant un avantage sélectif aux virus transmis à l'enfant. Cependant, nous avons observé que les virus transmis à l'enfant étaient significativement plus sensibles à la neutralisation par PG9 et PG16 que les variants maternels. Une constatation qui, si elle était confirmée dans d'autres populations et sur un effectif plus important, pourrait avoir des implications intéressantes tant pour la prévention de la transmission mère-enfant du VIH-1 que pour l'orientation de la conception d'immunogènes vaccinaux.

Lors de l'étude précédemment décrite, nous avons mis en évidence que les clones maternels présentaient une hétérogénéité dans la sensibilité à la neutralisation par PG9 et PG16 (Thenin *et al.*, 2012). Ces anticorps monoclonaux possèdent une activité neutralisante exceptionnelle en neutralisant 70 à 80% des isolats circulants, suggérant ainsi que les épitopes cibles seraient hautement conservés au sein de variants du VIH-1 du groupe M. Je me suis donc appuyée sur le matériel biologique généré lors de l'étude précédente afin d'étudier les déterminants moléculaires impliqués dans la résistance à PG9 et PG16.

Nous nous sommes focalisés sur la sensibilité à PG9 et PG16 de 10 virus pseudotypés exprimant des enveloppes issus de la quasi-espèce virale de 3 mères infectées par des virus de sous-type CRF01_AE provenant de l'étude précédente (5 clones provenant de la mère 0377, 2 clones de la mère 0858 et 3 clones de la mère 0978) (Thenin *et al.*, 2012). Nous avons observé une forte hétérogénéité de la sensibilité à PG9 et PG16 au sein de clones génétiquement très proches provenant d'un même individu, et avons alors émis l'hypothèse que l'analyse de variants génétiquement très proches mais présentant des sensibilités différentes à PG9 et

PG16 pourrait permettre l'identification de déterminants moléculaires impliqués dans la résistance à la neutralisation par PG9 et PG16.

Pour le cas 0978, nous avons obtenu 3 clones (0978-M1-M3). Le clone 0978-M3 était résistant à PG9 et PG16 alors que les clones 0978-M1 et 0978-M2 présentaient une forte sensibilité aux deux anticorps monoclonaux. L'alignement des séquences protéiques d'enveloppes de ces 3 clones a montré que le clone 0978-M3 différait des clones 0978-M1/M2 par une unique substitution acide glutamique (E) *versus* lysine (K) en position 170 dans la boucle variable V2 (correspondant à la position 168 dans la séquence protéique d'enveloppe de la souche de référence HxB2). Cette substitution K168E avait été décrite comme étant impliquée dans la résistance à PG9 et PG16 d'une souche de référence de sous-type B (Walker *et al.*, 2009). De plus, McLellan *et al.* ont récemment montré que ce résidu était directement impliqué dans la liaison à PG9 (McLellan *et al.*, 2011). L'analyse des séquences d'enveloppes disponibles dans la database de Los Alamos a montré que la présence d'un acide glutamique en position 168 est inhabituelle, alors qu'un résidu basique (lysine ou arginine) est retrouvé à cette position dans la plupart des séquences. Afin d'explorer l'impact de la substitution K168E dans la résistance à la neutralisation du clone 0978-M3, nous avons introduit par mutagenèse dirigée la substitution K168E dans le clone sensible 0978-M2 (0978-M2 K168E) et la substitution inverse E168K dans le clone résistant 0978-M3 (0978-M3 E168K). Nous avons mis en évidence que la substitution K168E avait un impact majeur sur la sensibilité à PG9 et PG16, confirmant ainsi dans un virus non-B que la présence d'un résidu basique ou acide en position 168 dans la boucle V2 est un élément important déterminant la sensibilité à PG9 et PG16.

Pour le cas 0858, les deux clones obtenus présentaient des profils de neutralisation divergeants : le clone 0858-M1 était sensible à PG9 mais résistant à PG16, alors que le clone 0858-M2 était résistant aux deux anticorps monoclonaux. L'alignement des séquences protéiques d'enveloppe a révélé que ces deux clones différaient par seulement deux substitutions localisées dans deux régions constantes. Le clone 0858-M1 a deux isoleucines (I) en position 215 (région C2) et 475 (région C5) alors que le clone 0858-M2 a deux méthionines (M) à ces positions. L'analyse des séquences d'enveloppes provenant de la database a mis en évidence une très forte conservation d'une isoleucine en position 215 alors que la présence d'une isoleucine en position 475 est moins fréquente et varie selon les sous-types. Afin d'explorer le rôle des deux méthionines dans la résistance à la neutralisation du

clone 0858-M2, nous avons introduit par mutagenèse dirigée les substitutions M215I et M475I dans ce clone (0858-M2 M215I et 0858-M2 M475I). Nous avons mis en évidence qu'une méthionine en position 215 dans le domaine constant C2 a un impact majeur sur la résistance à PG9 dans un clone de sous-type CRF01_AE.

Afin de valider le rôle d'une méthionine en position 215 dans la résistance à PG9 et PG16, nous avons étudié la sensibilité à la neutralisation par ces deux anticorps monoclonaux d'un panel de virus pseudotypés exprimant les enveloppes de 4 clones additionnels de sous-type CRF01_AE provenant de l'étude antérieure (Thenin *et al.*, 2012), et 6 clones de sous-type B issus de trois patients asymptomatiques à long terme provenant d'études précédemment réalisées au laboratoire (Braibant *et al.*, 2008 ; Chaillon *et al.*, 2011). Ces 10 clones possédaient une isoleucine en position 215 et étaient sensibles à la neutralisation par PG9 et PG16. Par mutagenèse dirigée nous avons introduit la substitution I215M dans ces 10 clones et montré que cette substitution diminuait de façon significative la sensibilité à PG9 et PG16 des clones mutés I215M, avec néanmoins, des variations de sensibilité dépendantes des clones, illustrant la complexité antigénique des glycoprotéines d'enveloppes du VIH-1. Ces résultats indiquent cependant clairement qu'une méthionine en position 215 dans le domaine constant C2 a un impact sur la sensibilité à PG9 et PG16 sur des variants appartenant à deux sous-types différents.

A la vue de ces résultats, nous avons voulu savoir si la substitution I215M affectait d'autres propriétés antigéniques des glycoprotéines d'enveloppes. Pour cela nous avons étudié la sensibilité à la neutralisation des différents virus pseudotypés sauvages et mutés de sous-type B et CRF01_AE par les anticorps monoclonaux b12, 2F5, 4E10 et 2G12. Aucune différence significative n'a été observée dans la sensibilité à la neutralisation par ces 4 anticorps monoclonaux entre les clones sauvages ou mutés, suggérant ainsi que ces autres sites antigéniques de la gp120 n'étaient pas affectés par la présence d'une méthionine en position 215. Il est ainsi possible de penser que la conformation de la gp120 n'est que peu modifiée par cette substitution.

Dans le but d'essayer de comprendre l'implication du résidu M215 dans la résistance à PG9 et PG16, nous avons réalisé un modèle en trois dimensions de la structure de la gp120 du clone 0858-M2 sous sa forme monomérique et trimérique. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence que le résidu M215 était localisé à la surface du monomère de la gp120, à proximité

de l'épitope PG9 au sein du monomère voisin. Dans le contexte de l'enveloppe trimérique, nous pouvons émettre l'hypothèse que la nature du résidu en position 215 stabiliserait ou non la liaison de PG9 et PG16 à l'épitope sur le monomère voisin. De plus, la position de ce résidu, à proximité de la base des boucles V1/V2 pourrait influencer la conformation tertiaire et quaternaire de la gp120 en modifiant la structure ou l'exposition de l'épitope cible.

En conclusion, l'analyse de la sensibilité à PG9 et PG16 de clones d'enveloppes génétiquement très proches provenant de patients infectés par des virus de sous-type CRF01_AE et B nous a permis de démontrer l'implication de deux résidus de la gp120 très conservés dans la sensibilité à la neutralisation par PG9 et PG16. Nous avons confirmé dans un virus non-B qu'un résidu acide ou basique en position 168 dans la boucle variable V2 est un élément important déterminant la sensibilité à PG9 et PG16. Nous avons également montré qu'une méthionine en position 215 dans le domaine constant C2 avait un impact majeur sur la résistance à la neutralisation par PG9 et/ou PG16 sur des virus appartenant à deux sous-types différents. Notre étude démontre donc que l'analyse de la sensibilité par différents anticorps monoclonaux de variants naturels génétiquement très proches issus de la quasi-espèce virale d'un individu donné est une stratégie intéressante qui peut fournir des données pertinentes, complémentaires à celles obtenues par l'analyse de la sensibilité à la neutralisation d'une librairie de mutants d'une souche de référence de laboratoire tel que cela est régulièrement pratiqué (Walker *et al.*, 2009).

Conclusion & perspectives

La transmission mère-enfant est un modèle naturel permettant d'explorer le rôle des anticorps neutralisants dans la protection vis-à-vis de l'infection par le VIH-1. Ceci est d'autant plus vrai lorsque la transmission se fait tardivement, notamment en peripartum, le fœtus ou nouveau-né étant alors exposé au virus en présence d'anticorps maternels passifs pré-existants dont certains ont une activité neutralisante de plus ou moins large spectre.

Dans le cadre d'un projet collaboratif avec le groupe de M Lallemand (IRD URI 174, Chiang Mai, Thaïlande), notre équipe avait montré sur une population thaïlandaise que la présence ou les titres élevés d'anticorps neutralisant un isolat primaire hétérologue de sous-type CRF01_AE, MBA, étaient associés à un risque plus faible de transmission intrapartum du VIH-1 (Barin *et al.*, 2006). Une étude complémentaire, réalisée sur une population thaïlandaise plus large avec des critères de sélection particulièrement stringents, a confirmé l'association précédemment observée et a mis en évidence que MBA était plus résistant à la neutralisation que deux autres virus du même sous-type C1712 et LEA. Ces données suggéraient ainsi que l'isolat MBA serait un bon indicateur de la présence d'anticorps neutralisants associés à l'absence de transmission intrapartum chez des patientes infectées par des virus de sous-type CRF01_AE (Samleerat *et al.*, 2009). Mon travail de thèse a donc consisté à identifier les caractéristiques moléculaires de l'enveloppe de l'isolat MBA pouvant expliquer l'association observée ainsi que la résistance à la neutralisation de ce virus. La comparaison des séquences protéiques d'enveloppes des trois virus de sous-type CRF01_AE (MBA, LEA et C1712) a mis en évidence que l'enveloppe de MBA possédait une région variable V2 exceptionnellement longue et fortement glycosylée. La construction d'enveloppes chimères en intervertissant les domaines V2 des enveloppes des virus de MBA et LEA ainsi que la comparaison des profils de neutralisation de virus pseudotypés porteurs des enveloppes parentales LEA et MBA ou de l'enveloppe chimère composée du domaine V2 de MBA dans le squelette d'enveloppe de LEA, nous a permis de mettre en évidence que le long domaine V2 de MBA contribuait à la résistance à la neutralisation de ce virus. Ces travaux ont montré que la boucle V2 de la gp120 est impliquée dans la neutralisation virale, apportant ainsi un élément supplémentaire de l'importance de cette région dans la neutralisation comme l'attestent désormais les données de la littérature (Gray *et al.*, 2007a, 2011b ; Lynch *et al.*, 2011b ; Moore *et al.*, 2008, 2009a, 2011 ; Pinter *et al.*, 2004, 2005 ; Rong *et al.*, 2007a, 2009 ; Sagar *et al.*, 2006 ; Tomaras *et al.*, 2011 ; van Gils *et al.*, 2011a ; Walker *et al.*, 2010 ; Wolk *et al.*, 2006).

Une analyse moléculaire des virus transmis de la mère à l'enfant chez 17 paires mère-enfant infectées par des virus de sous-type CRF01_AE, réalisée antérieurement dans notre équipe, avait mis en évidence que deux PNGS, N301 localisé à la base de la boucle variable V3 et N384 localisé dans le domaine constant C3, étaient retrouvés systématiquement dans tous les clones des virus de nouveau-nés mais irrégulièrement dans les clones de virus maternels au sein des couples mère-enfant. Ceci suggérait que ces PNGS pourraient conférer un avantage sélectif aux variants transmis (Samleerat *et al.*, 2008). La deuxième partie de mon projet de thèse avait pour objectif d'analyser les propriétés antigéniques et fonctionnelles de 17 virus pseudotypés porteurs d'enveloppes de clones maternels et de clones transmis à l'enfant issus de 4 paires mère-enfant provenant de l'étude moléculaire antérieure, selon que ces variants possédaient ou non les deux PNGS. Ces travaux ont mis en évidence que les virus transmis à l'enfant ainsi que les variants présents chez leurs mères chroniquement infectées présentaient une très grande hétérogénéité des propriétés biologiques, et ce malgré la présence d'une population virale génétiquement restreinte chez les enfants. Nous avons confirmé que les sites de N-glycosylation N301 et N384 sembleraient jouer un rôle dans la résistance à la neutralisation autologue bien que non-associés à l'infectivité et à la sensibilité au CD4 soluble. Nous n'avons pas observé de différence dans la sensibilité à la neutralisation autologue et hétérologue entre les variants maternels et les variants transmis à l'enfant. Ces données sont en accord avec des études récentes qui suggèrent que la restriction de la population observée lors de la transmission verticale ne serait pas en faveur d'une pression de sélection médiée par les anticorps neutralisants maternels (Lynch *et al.*, 2011a ; Kishko *et al.*, 2011 ; Russell *et al.*, 2011). Ni le clivage et l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les virions, ni le niveau d'infectivité et la sensibilité au CD4s et au TAK-779 ne sont associés à la transmission. Nous n'avons donc pas identifié de caractéristiques moléculaires conférant un avantage sélectif aux virus transmis à l'enfant. Cependant, nous avons observé que les virus transmis à l'enfant étaient significativement plus sensibles à la neutralisation par PG9 et PG16, deux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants récemment identifiés, que les variants maternels. Il serait intéressant de vérifier si ces observations sont confirmées sur un effectif plus important et dans d'autres populations infectées par d'autres sous-types viraux. Si tel était le cas, les anticorps PG9 et PG16 pourraient avoir des implications intéressantes tant pour une immunoprophylaxie dans le cadre de la transmission mère-enfant du VIH-1 que pour l'orientation de la conception d'immunogènes vaccinaux.

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence que les clones maternels présentaient une hétérogénéité dans la sensibilité à la neutralisation par PG9 et PG16. Ceci nous a permis d'identifier deux résidus très conservés de la gp120, une lysine en position 168 dans la boucle V2 et une isoleucine en position 215 dans le domaine constant C2, dont les substitutions (K168E et I215M) sont associées à une résistance à PG9 et PG16. Nous avons ainsi confirmé dans un virus non-B que la présence d'un résidu basique ou acide en position 168 dans la boucle V2 est un élément important déterminant la sensibilité à PG9 et PG16. Par ailleurs, nous avons montré qu'une méthionine en position 215 avait un impact majeur sur la sensibilité à PG9 et PG16 sur des variants appartenant à deux sous-types différents, B et CRF01_AE, sans que cette substitution affecte pour autant la sensibilité à d'autres anticorps de référence largement neutralisants. Notre étude démontre donc que l'analyse de la sensibilité par différents anticorps monoclonaux de variants naturels génétiquement très proches issus de la quasi-espèce virale d'individus infectés est une stratégie intéressante qui peut fournir des données pertinentes, complémentaires à celles obtenues par l'analyse de la sensibilité sur des mutants d'une souche de référence de laboratoire.

Pour finir, la stratégie développée au cours de mes travaux de thèse pour l'obtention de virus pseudotypés porteurs de protéine d'enveloppe d'intérêt a été adaptée à d'autres travaux réalisés dans le laboratoire. Ce transfert de technologie m'a permis d'être associée au travail d'Antoine Chaillon, doctorant dans l'unité (Chaillon *et al.*, 2012).

Bibliographie

- Aasa-Chapman, M. M. I., Hayman, A., Newton, P., Cornforth, D., Williams, I., Borrow, P., Balfe, P. & McKnight, A. (2004).** Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. *AIDS* **18**, 371-381.
- Ahmad, N., Baroudy, B. M., Baker, R. C. & Chappey, C. (1995).** Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope V3 region isolates from mothers and infants after perinatal transmission. *J Virol* **69**, 1001-1012.
- Ait-Khaled, M., Lyall, E. G., Stainsby, C., Taylor, G. P., Wright, A., Weber, J. N., McClure, M. O. & Tudor-Williams, G. (1998).** Intrapartum mucosal exposure to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) of infants born to HIV-1-infected mothers correlates with maternal plasma virus burden. *J Infect Dis* **177**, 1097-1100.
- Alam, S. M., McAdams, M., Boren, D., Rak, M., Scarce, R. M., Gao, F., Camacho, Z. T., Gewirth, D., Kelsoe, G., & other authors. (2007).** The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. *J Immunol* **178**, 4424-4435.
- Al-Harthi, L., Guilbert, L. J., Hoxie, J. A. & Landay, A. (2002).** Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 13-17.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. & Berger, E. A. (1996).** CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.
- Alter, G. & Moody, M. A. (2010).** The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J Infect Dis* **202 Suppl 2**, S315-322.
- Arhel, N. (2010).** Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* **7**, 96.
- Arias, R. A., Muñoz, L. D. & Muñoz-Fernández, M. A. (2003).** Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* **307**, 266-277.
- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T. D., Conrad, T. P., & other authors. (2008).** HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* **9**, 301-309.
- Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr, Sowder, R. C., 2nd, Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J. C. & Henderson, L. E. (1992).** Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**, 1935-1938.
- Ayoub, A., Souquière, S., Njinku, B., Martin, P. M., Müller-Trutwin, M. C., Roques, P., Barré-Sinoussi, F., Maucière, P., Simon, F. & Nerrienet, E. (2000).** HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* **14**, 2623-2625.
- Baba, T. W., Koch, J., Mittler, E. S., Greene, M., Wyand, M., Penninck, D. & Ruprecht, R. M. (1994).** Mucosal infection of neonatal rhesus monkeys with cell-free SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 351-357.
- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., & other authors. (2000).** Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**, 200-206.
- Bahbouhi, B., Chazal, N., Seidah, N. G., Chiva, C., Kogan, M., Albericio, F., Giralt, E. & Bahraoui, E. (2002).** Effects of L- and D-REKR amino acid-containing peptides on HIV and SIV envelope glycoprotein precursor maturation and HIV and SIV replication. *Biochem J* **366**, 863-872.
- Baillou, A., Janvier, B., Leonard, G., Denis, F., Goudeau, A. & Barin, F. (1991).** Fine serotyping of human immunodeficiency virus serotype 1 (HIV-1) and HIV-2 infections by using synthetic oligopeptides representing an immunodominant domain of HIV-1 and HIV-2/simian immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* **29**, 1387-1391.
- Balla-Jhaghoorsingh, S. S., Willems, B., Heyndrickx, L., Heyndrickx, L., Vereecken, K., Janssens, W., Seaman, M. S., Corti, D., Lanzavecchia, A., & other authors. (2011).** Characterization of neutralizing profiles in HIV-1 infected patients from whom the HJ16, HGN194 and HK20 mAbs were obtained. *PLoS ONE* **6**, e25488.

Barbas, C. F., 3rd, Björling, E., Chiodi, F., Dunlop, N., Cababa, D., Jones, T. M., Zebedee, S. L., Persson, M. A., Nara, P. L. & Norrby, E. (1992). Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9339-9343.

Barin, F., M'Boup, S., Denis, F., Kanki, P., Allan, J. S., Lee, T. H. & Essex, M. (1985). Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* **2**, 1387-1389.

Barin, F. (2002). Virus de l'immunodéficience humaine et anticorps neutralisants. *Virologie* **6**, 249-247.

Barin, F., Jourdain, G., Brunet, S., Ngo-Giang-Huong, N., Weerawatgoompa, S., Karnchanamayul, W., Ariyadej, S., Hansudewechakul, R., Achalapong, J., & other authors. (2006). Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis* **193**, 1504-1511.

Barouch, D. H. (2008). Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* **455**, 613-619.

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

Barré-Sinoussi, F. (2003). The early years of HIV research: integrating clinical and basic research. *Nat Med* **9**, 844-846.

Baum, L. L. (2010). Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Curr HIV/AIDS Rep* **7**, 11-18.

Beaumont, E., Vendrame, D., Verrier, B., Roch, E., Biron, F., Barin, F., Mammano, F. & Brand, D. (2009). Matrix and envelope coevolution revealed in a patient monitored since primary infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **83**, 9875-9889.

Biggar, R. J., Cassol, S., Kumwenda, N., Lema, V., Janes, M., Pilon, R., Senzani, V., Yellin, F., Taha, T. E. T. & Broadhead, R. L. (2003). The risk of human immunodeficiency virus-1 infection in twin pairs born to infected mothers in Africa. *J Infect Dis* **188**, 850-855.

Binley, J. (2009). Specificities of broadly neutralizing anti-HIV-1 sera. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 364-372.

Binley, J. M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M. B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., & other authors. (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* **78**, 13232-13252.

Binley, J. M., Lybarger, E. A., Crooks, E. T., Seaman, M. S., Gray, E., Davis, K. L., Decker, J. M., Wycuff, D., Harris, L., & other authors. (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.

Blish, C. A., Blay, W. M., Haigwood, N. L. & Overbaugh, J. (2007). Transmission of HIV-1 in the face of neutralizing antibodies. *Curr HIV Res* **5**, 578-587.

Bongertz, V., Costa, C. I., Veloso, V. G., Grinsztejn, B., João Filho, E. C., Calvet, G., Pilotto, J. H., Guimarães, M. L. & Morgado, M. G. (2001). Vertical HIV-1 transmission: importance of neutralizing antibody titer and specificity. *Scand J Immunol* **53**, 302-309.

Bongertz, V., Costa, C. I., Veloso, V. G., Grinsztejn, B., Filho, E. C. J., Calvet, G. & Pilotto, J. H. (2002). Neutralization titres and vertical HIV-1 transmission. *Scand J Immunol* **56**, 642-644.

Bonomelli, C., Doores, K. J., Dunlop, D. C., Thaney, V., Dwek, R. A., Burton, D. R., Crispin, M. & Scanlan, C. N. (2011). The glycan shield of HIV is predominantly oligomannose independently of production system or viral clade. *PLoS ONE* **6**, e23521.

Bonsignori, M., Hwang, K.-K., Chen, X., Tsao, C.-Y., Morris, L., Gray, E., Marshall, D. J., Crump, J. A., Kapiga, S. H., & other authors. (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.

Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H., Autran, B. & Barin, F. (2006). Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *AIDS* **20**, 1923-1930.

Braibant, M., Agut, H., Rouzioux, C., Costagliola, D., Autran, B. & Barin, F. (2008). Characteristics of the env genes of HIV type 1 quasiespecies in long-term nonprogressors with broadly neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* **47**, 274-284.

Braibant, M., Xie, J., Samri, A., Agut, H., Autran, B. & Barin, F. (2010). Disease progression due to dual infection in an HLA-B57-positive asymptomatic long-term nonprogressor infected with a nef-defective HIV-1 strain. *Virology* **405**, 81-92.

Braibant, M., Chaillon, A. & Barin, F. (2011). Rôle des anticorps neutralisants dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). *Virologie* **15**, 23-35.

Briant, L., Wade, C. M., Puel, J., Brown, A. J. & Guyader, M. (1995). Analysis of envelope sequence variants suggests multiple mechanisms of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**, 3778-3788.

Briggs, J. A. G. & Kräusslich, H.-G. (2011). The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol* **410**, 491-500.

Brossard, Y., Aubin, J. T., Mandelbrot, L., Bignozzi, C., Brand, D., Chaput, A., Roume, J., Mulliez, N., Mallet, F. & Agut, H. (1995). Frequency of early in utero HIV-1 infection: a blind DNA polymerase chain reaction study on 100 fetal thymuses. *AIDS* **9**, 359-366.

Brunel, F. M., Zwick, M. B., Cardoso, R. M. F., Nelson, J. D., Wilson, I. A., Burton, D. R. & Dawson, P. E. (2006). Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J Virol* **80**, 1680-1687.

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

Bulterys, M., Chao, A., Dushimimana, A., Kageruka, M., Nawrocki, P. & Saah, A. J. (1992). HIV-exposed twins. *Lancet* **339**, 628.

Bulterys, M., Ellington, S. & Kourtis, A. P. (2010). HIV-1 and breastfeeding: biology of transmission and advances in prevention. *Clin Perinatol* **37**, 807-824, ix-x.

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

Bunnik, E. M., Euler, Z., Welkers, M. R. A., Boeser-Nunnink, B. D. M., Grijsen, M. L., Prins, J. M. & Schuitemaker, H. (2010a). Adaptation of HIV-1 envelope gp120 to humoral immunity at a population level. *Nat Med* **16**, 995-997.

Bunnik, E. M., Lobbrecht, M. S. D., van Nuenen, A. C. & Schuitemaker, H. (2010b). Escape from autologous humoral immunity of HIV-1 is not associated with a decrease in replicative capacity. *Virology* **397**, 224-230.

Bunnik, E. M., van Gils, M. J., Lobbrecht, M. S. D., Pisas, L., Nanlohy, N. M., van Baarle, D., van Nuenen, A. C., Hessel, A. J. & Schuitemaker, H. (2010c). Emergence of monoclonal antibody b12-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants during natural infection in the absence of humoral or cellular immune pressure. *J Gen Virol* **91**, 1354-1364.

Buonaguro, L., Tornesello, M. L. & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* **81**, 10209-10219.

Burton, D. R., Barbas, C. F., 3rd, Persson, M. A., Koenig, S., Chanock, R. M. & Lerner, R. A. (1991). A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10134-10137.

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

Burton, D. R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* **2**, 706-713.

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

Burton, D. R., Hessel, A. J., Keele, B. F., Klasse, P. J., Ketas, T. A., Moldt, B., Dunlop, D. C., Poignard, P., Doyle, L. A., & other authors. (2011). Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 11181-11186.

Burton, D. R., Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. (2005). Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14943 - 14948.

Buzon, V., Natrajan, G., Schibli, D., Campelo, F., Kozlov, M. M. & Weissenhorn, W. (2010). Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog* **6**, e1000880.

Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., & other authors. (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. & Wilson, I. A. (2005). Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13372-13377.

Cardoso, R. M. F., Zwick, M. B., Stanfield, R. L., Kunert, R., Binley, J. M., Katinger, H., Burton, D. R. & Wilson, I. A. (2005). Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity* **22**, 163-173.

Cardozo, T., Kimura, T., Philpott, S., Weiser, B., Burger, H. & Zolla-Pazner, S. (2007). Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 415-426.

Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, A. W., Hegerich, P. A., St Louis, D., Burke, D. S. & McCutchan, F. E. (1996). Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol* **70**, 5935-5943.

Casadevall, A. (1999). Passive antibody therapies: progress and continuing challenges. *Clin Immunol* **93**, 5-15.

Casadevall, A., Dadachova, E. & Pirofski, L.-anne. (2004). Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 695-703.

Cavarelli, M. & Scarlatti, G. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission and prevention: successes and controversies. *J Intern Med* **270**, 561-579.

Chaillon, A., Braibant, M., Moreau, T., Thenin, S., Moreau, A., Autran, B. & Barin, F. (2011). The V1V2 domain and an N-linked glycosylation site in the V3 loop of the HIV-1 envelope glycoprotein modulate neutralization sensitivity to the human broadly neutralizing antibody 2G12. *J Virol* **85**, 3642-3648.

Chakrabarti, B. K., Walker, L. M., Guenaga, J. F., Ghobbeh, A., Poignard, P., Burton, D. R. & Wyatt, R. T. (2011). Direct antibody access to the HIV-1 membrane-proximal external region positively correlates with neutralization sensitivity. *J Virol* **85**, 8217-8226.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.

Checkley, M. A., Luttge, B. G. & Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* **410**, 582-608.

Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Harrison, S. C. (2005). Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **433**, 834-841.

Chen, L., Kwon, Y. D., Zhou, T., Wu, X., O'Dell, S., Cavacini, L., Hessel, A. J., Pancera, M., Tang, M., & other authors. (2009). Structural basis of immune evasion at the site of CD4 attachment on HIV-1 gp120. *Science* **326**, 1123-1127.

Chohan, B., Lang, D., Sagar, M., Korber, B., Lavreys, L., Richardson, B. & Overbaugh, J. (2005). Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J Virol* **79**, 6528-6531.

Cicala, C., Arthos, J. & Fauci, A. S. (2011). HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *J Transl Med* **9** Suppl 1, S2.

Clapham, P. R. & McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol* **83**, 1809-1829.

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

Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J. & Haynes, B. F. (2011). Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* **364**, 1943-1954.

Corti, D., Langedijk, J. P. M., Hinz, A., Seaman, M. S., Vanzetta, F., Fernandez-Rodriguez, B. M., Silacci, C., Pinna, D., Jarrossay, D., & other authors. (2010). Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS ONE* **5**, e8805.

Dacheux, L., Moreau, A., Ataman-Onal, Y., Biron, F., Verrier, B. & Barin, F. (2004). Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J Virol* **78**, 12625-12637.

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

David, F. J., Autran, B., Tran, H. C., Menu, E., Raphael, M., Debre, P., Hsi, B. L., Wegman, T. G., Barre-Sinoussi, F. & Chaouat, G. (1992). Human trophoblast cells express CD4 and are permissive for productive infection with HIV-1. *Clin Exp Immunol* **88**, 10-16.

Davis, K. L., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Decker, J. M., Kutsch, O., Morris, L., Salomon, A., Pinter, A., Hoxie, J. A., & other authors. (2009a). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2)/HIV-1 envelope chimeras detect high titers of broadly reactive HIV-1 V3-specific antibodies in human plasma. *J Virol* **83**, 1240-1259.

Davis, K. L., Gray, E. S., Moore, P. L., Decker, J. M., Salomon, A., Montefiori, D. C., Graham, B. S., Keefer, M. C., Pinter, A., & other authors. (2009b). High titer HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination. *Virology* **387**, 414-426.

De Jong, J. J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M. & Goudsmit, J. (1992). Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* **66**, 6777-6780.

De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P. & Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* **64**, 1207-1216.

Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Wang, S., Levy, D. N., Wang, W., Delaporte, E., Peeters, M., Derdeyn, C. A., & other authors. (2005). Antigenic conservation and immunogenicity of the HIV coreceptor binding site. *J Exp Med* **201**, 1407-1419.

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

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

Derdeyn, C. A., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Mokili, J. L., Muldoon, M., Denham, S. A., Heil, M. L., Kasolo, F., Musonda, R., & other authors. (2004). Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* **303**, 2019-2022.

- Dhillon, A. K., Donners, H., Pantophlet, R., Johnson, W. E., Decker, J. M., Shaw, G. M., Lee, F.-H., Richman, D. D., Doms, R. W., & other authors. (2007).** Dissecting the neutralizing antibody specificities of broadly neutralizing sera from human immunodeficiency virus type 1-infected donors. *J Virol* **81**, 6548-6562.
- Dickover, R. E., Garratty, E. M., Plaeger, S. & Bryson, Y. J. (2001).** Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J Virol* **75**, 2194-2203.
- Dickover, R., Garratty, E., Yusim, K., Miller, C., Korber, B. & Bryson, Y. (2006).** Role of maternal autologous neutralizing antibody in selective perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 escape variants. *J Virol* **80**, 6525-6533.
- Doms, R. W. & Moore, J. P. (2000).** HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* **151**, F9-14.
- Doores, K. J. & Burton, D. R. (2010).** Variable loop glycan dependency of the broad and potent HIV-1-neutralizing antibodies PG9 and PG16. *J Virol* **84**, 10510-10521.
- Doores, K. J., Bonomelli, C., Harvey, D. J., Vasiljevic, S., Dwek, R. A., Burton, D. R., Crispin, M. & Scanlan, C. N. (2010a).** Envelope glycans of immunodeficiency virions are almost entirely oligomannose antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 13800-13805.
- Doores, K. J., Fulton, Z., Huber, M., Wilson, I. A. & Burton, D. R. (2010b).** Antibody 2G12 recognizes di-mannose equivalently in domain- and nondomain-exchanged forms but only binds the HIV-1 glycan shield if domain exchanged. *J Virol* **84**, 10690-10699.
- Doria-Rose, N. A., Klein, R. M., Manion, M. M., O'Dell, S., Phogat, A., Chakrabarti, B., Hallahan, C. W., Migueles, S. A., Wrammert, J., & other authors. (2009).** Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *J Virol* **83**, 188-199.
- 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., & other authors. (2010).** Breadth of human immunodeficiency virus-specific neutralizing activity in sera: clustering analysis and association with clinical variables. *J Virol* **84**, 1631-1636.
- Douek, D. C., Picker, L. J. & Koup, R. A. (2003).** T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* **21**, 265-304.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., & other authors. (1996).** HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- Dubé, M., Bego, M. G., Paquay, C. & Cohen, É. A. (2010).** Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* **7**, 114.
- Duenas-Decamp, M. J. & Clapham, P. R. (2010).** HIV-1 gp120 determinants proximal to the CD4 binding site shift protective glycans that are targeted by monoclonal antibody 2G12. *J Virol* **84**, 9608-9612.
- Duenas-Decamp, M. J., Peters, P., Burton, D. & Clapham, P. R. (2008).** Natural resistance of human immunodeficiency virus type 1 to the CD4bs antibody b12 conferred by a glycan and an arginine residue close to the CD4 binding loop. *J Virol* **82**, 5807-5814.
- Duliège, A. M., Amos, C. I., Felton, S., Biggar, R. J. & Goedert, J. J. (1995).** Birth order, delivery route, and concordance in the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mothers to twins. International Registry of HIV-Exposed Twins. *J Pediatr* **126**, 625-632.
- Englund, J., Glezen, W. P. & Piedra, P. A. (1998).** Maternal immunization against viral disease. *Vaccine* **16**, 1456-1463.
- Esté, J. A. & Telenti, A. (2007).** HIV entry inhibitors. *Lancet* **370**, 81-88.
- Euler, Z., van Gils, M. J., Bunnik, E. M., Phung, P., Schweighardt, B., Wrin, T. & Schuitemaker, H. (2010).** Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *J Infect Dis* **201**, 1045-1053.

Euler, Z., Bunnik, E. M., Burger, J. A., Boeser-Nunnink, B. D. M., Grijzen, M. L., Prins, J. M. & Schuitemaker, H. (2011). Activity of broadly neutralizing antibodies, including PG9, PG16, and VRC01, against recently transmitted subtype B HIV-1 variants from early and late in the epidemic. *J Virol* **85**, 7236-7245.

European Collaboratory Study, Boer, K., England, K., Godfried, M. & Thorne, C. (2010). Mode of delivery in HIV-infected pregnant women and prevention of mother-to-child transmission: changing practices in Western Europe. *HIV Med* **11**, 368-378.

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

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

Ferrantelli, F., Rasmussen, R. A., Buckley, K. A., Li, P.-L., Wang, T., Montefiori, D. C., Katinger, H., Stiegler, G., Anderson, D. C., & other authors. (2004). Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies. *J Infect Dis* **189**, 2167-2173.

Ferrantelli, F., Buckley, K. A., Rasmussen, R. A., Chalmers, A., Wang, T., Li, P.-L., Williams, A. L., Hofmann-Lehmann, R., Montefiori, D. C., & other authors. (2007). Time dependence of protective post-exposure prophylaxis with human monoclonal antibodies against pathogenic SHIV challenge in newborn macaques. *Virology* **358**, 69-78.

Forthal, D. N. & Moog, C. (2009). Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 388-393.

Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F. & Schuitemaker, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* **66**, 3183-3187.

Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 13-33.

Freed, E. O., Myers, D. J. & Risser, R. (1989). Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J Virol* **63**, 4670-4675.

Frost, S. D. W., Wrin, T., Smith, D. M., Kosakovsky Pond, S. L., Liu, Y., Paxinos, E., Chappey, C., Galovich, J., Beauchaine, J., & other authors. (2005). Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 18514-18519.

Fuchs, R. & Ellinger, I. (2004). Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic* **5**, 725-738.

Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M. & Sundquist, W. I. (2008). The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 203-217.

Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., & other authors. (1996). The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* **70**, 7013-7029.

Gao, F., Robertson, D. L., Carruthers, C. D., Morrison, S. G., Jian, B., Chen, Y., Barré-Sinoussi, F., Girard, M., Srinivasan, A., & other authors. (1998). A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 5680-5698.

Gao, F., Chen, Y., Levy, D. N., Conway, J. A., Kepler, T. B. & Hui, H. (2004). Unselected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 genome are mostly nonsynonymous and often deleterious. *J Virol* **78**, 2426-2433.

- Gardella, B., Roccio, M., Maccabruni, A., Mariani, B., Panzeri, L., Zara, F. & Spinillo, A. (2011).** HIV Shedding in Cervico-Vaginal Secretions in Pregnant Women. *Curr HIV Res.*
- Gauduin, M. C., Parren, P. W., Weir, R., Barbas, C. F., Burton, D. R. & Koup, R. A. (1997).** Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat Med* **3**, 1389-1393.
- Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. (2001).** DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 receptor present in placenta that infects T cells in trans-a review. *Placenta* **22 Suppl A**, S19-23.
- Goedert, J. J., Duliège, A. M., Amos, C. I., Felton, S. & Biggar, R. J. (1991).** High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins. *Lancet* **338**, 1471-1475.
- Goila-Gaur, R. & Strebel, K. (2008).** HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**, 51.
- Gray, E. S., Moore, P. L., Choge, I. A., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., & other authors. (2007a).** Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* **81**, 6187-6196.
- Gray, E. S., Moore, P. L., Pantophlet, R. A. & Morris, L. (2007b).** N-linked glycan modifications in gp120 of human immunodeficiency virus type 1 subtype C render partial sensitivity to 2G12 antibody neutralization. *J Virol* **81**, 10769-10776.
- Gray, E. S., Moore, P. L., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Decker, J. M., Meyers, T., Shaw, G. M. & Morris, L. (2008).** 4E10-resistant variants in a human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected individual with an anti-membrane-proximal external region-neutralizing antibody response. *J Virol* **82**, 2367-2375.
- Gray, E. S., Taylor, N., Wycuff, D., Moore, P. L., Tomaras, G. D., Wibmer, C. K., Puren, A., DeCamp, A., Gilbert, P. B., & other authors. (2009a).** Antibody specificities associated with neutralization breadth in plasma from human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected blood donors. *J Virol* **83**, 8925-8937.
- Gray, E. S., Madiga, M. C., Moore, P. L., Mlisana, K., Abdool Karim, S. S., Binley, J. M., Shaw, G. M., Mascola, J. R. & Morris, L. (2009b).** Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol* **83**, 11265-11274.
- Gray, E. S., Moody, M. A., Wibmer, C. K., Chen, X., Marshall, D., Amos, J., Moore, P. L., Foulger, A., Yu, J.-S., & other authors. (2011a).** Isolation of a monoclonal antibody that targets the alpha-2 helix of gp120 and represents the initial autologous neutralizing-antibody response in an HIV-1 subtype C-infected individual. *J Virol* **85**, 7719-7729.
- Gray, E. S., Madiga, M. C., Hermanus, T., Moore, P. L., Wibmer, C. K., Tumba, N. L., Werner, L., Mlisana, K., Sibeko, S., & other authors. (2011b).** The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4⁺ T cell decline and high viral load during acute infection. *J Virol* **85**, 4828-4840.
- Grewe, B. & Uberla, K. (2010).** The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: ménage à trois during the early phase of the lentiviral replication cycle. *J Gen Virol* **91**, 1893-1897.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E. & Picker, L. J. (2006).** Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* **12**, 289-295.
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. & King, R. G. (2004).** Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* **114**, 397-407.
- Guevara, H., Casseb, J., Zijenah, L. S., Mbizvo, M., Ocegüera, L. F., 3rd, Hanson, C. V., Katzenstein, D. A. & Hendry, R. M. (2002).** Maternal HIV-1 antibody and vertical transmission in subtype C virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 435-440.
- Haase, A. T. (2005).** Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol* **5**, 783-792.
- Hangartner, L., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (2006).** Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol* **6**, 231-243.

Harris, A., Borgnia, M. J., Shi, D., Bartesaghi, A., He, H., Pejchal, R., Kang, Y. K., Depetris, R., Marozsan, A. J., & other authors. (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 USA* **108**, 11440-11445.

Hartley, O., Klasse, P. J., Sattentau, Q. J. & Moore, J. P. (2005). V3: HIV's switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 171-189.

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

Haynes, B. F., Moody, M. A., Liao, H.-X., Verkoczy, L. & Tomaras, G. D. (2011). B cell responses to HIV-1 infection and vaccination: pathways to preventing infection. *Trends Mol Med* **17**, 108-116.

Helenius, A. & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.

Helenius, A. & Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**, 1019-1049.

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. & Osmanov, S. (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* **25**, 679-689.

Hengel, R. L., Kennedy, M. S., Steketee, R. W., Thea, D. M., Abrams, E. J., Lambert, G. & McDougal, J. S. (1998). Neutralizing antibody and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 475-481.

Hessell, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E. G., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M. S., Landucci, G., Forthal, D. N., & other authors. (2007). Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* **449**, 101-104.

Hessell, A. J., Poignard, P., Hunter, M., Hangartner, L., Tehrani, D. M., Bleeker, W. K., Parren, P. W. H. I., Marx, P. A. & 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. & 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**, e1000433.

Hessell, A. J., Rakasz, E. G., Tehrani, D. M., Huber, M., Weisgrau, K. L., Landucci, G., Forthal, D. N., Koff, W. C., Poignard, P., & other authors. (2010). Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J Virol* **84**, 1302-1313.

Hladik, F. & McElrath, M. J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* **8**, 447-457.

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

Hofmann-Lehmann, R., Rasmussen, R. A., Vlasak, J., Smith, B. A., Baba, T. W., Liska, V., Montefiori, D. C., McClure, H. M., Anderson, D. C., & other authors. (2001a). Passive immunization against oral AIDS virus transmission: an approach to prevent mother-to-infant HIV-1 transmission? *J Med Primatol* **30**, 190-196.

Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Rasmussen, R. A., Smith, B. A., Baba, T. W., Liska, V., Ferrantelli, F., Montefiori, D. C., McClure, H. M., & other authors. (2001b). Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J Virol* **75**, 7470-7480.

Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Rasmussen, R. A., Jiang, S., Li, P. L., Baba, T. W., Montefiori, D. C., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., & other authors. (2002). Postnatal pre- and postexposure passive immunization strategies: protection of neonatal macaques against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J Med Primatol* **31**, 109-119.

Hoxie, J. A. (2010). Toward an antibody-based HIV-1 vaccine. *Annu Rev Med* **61**, 135-152.

Huang, C.-chin, Tang, M., Zhang, M.-Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber, B., Sodroski, J., & other authors. (2005). Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**, 1025-1028.

Huang, C.-C., Lam, S. N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S.-H., Hussan, S. S.-U., Stanfield, R. L., Robinson, J., Sodroski, J., & other authors. (2007). Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* **317**, 1930-1934.

Huber, M. & Trkola, A. (2007). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J Intern Med* **262**, 5-25.

Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. & Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**, 356-359.

Hu, G., Liu, J., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2011). Structural comparison of HIV-1 envelope spikes with and without the V1/V2 loop. *J Virol* **85**, 2741-2750.

Husson, R. N., Lan, Y., Kojima, E., Venzon, D., Mitsuya, H. & McIntosh, K. (1995). Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: autologous neutralizing antibody, virus load, and virus phenotype. *J Pediatr* **126**, 865-871.

Hwang, S. S., Boyle, T. J., Lyerly, H. K. & Cullen, B. R. (1991). Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71-74.

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. & Putney, S. D. (1989). Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6768-6772.

Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D. & Matthews, T. J. (1990). Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* **250**, 1590-1593.

Julien, J.-P., Bryson, S., Nieva, J. L. & Pai, E. F. (2008). Structural details of HIV-1 recognition by the broadly neutralizing monoclonal antibody 2F5: epitope conformation, antigen-recognition loop mobility, and anion-binding site. *J Mol Biol* **384**, 377-392.

Julien, J.-P., Huarte, N., Maeso, R., Taneva, S. G., Cunningham, A., Nieva, J. L. & Pai, E. F. (2010). Ablation of the complementarity-determining region H3 apex of the anti-HIV-1 broadly neutralizing antibody 2F5 abrogates neutralizing capacity without affecting core epitope binding. *J Virol* **84**, 4136-4147.

Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., & other authors. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523-526.

Keller, M. A. & Stiehm, E. R. (2000). Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **13**, 602-614.

Kind, C., Rudin, C., Siegrist, C. A., Wyler, C. A., Biedermann, K., Lauper, U., Irion, O., Schüpbach, J. & Nadal, D. (1998). Prevention of vertical HIV transmission: additive protective effect of elective Cesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. *AIDS* **12**, 205-210.

Kishko, M., Somasundaran, M., Brewster, F., Sullivan, J. L., Clapham, P. R. & Luzuriaga, K. (2011). Genotypic and functional properties of early infant HIV-1 envelopes. *Retrovirology* **8**, 67.

Klasse, P. J. & Sattentau, Q. J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* **83**, 2091-2108.

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

Koff, W. C. (2011). HIV vaccine development: Challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem. *Vaccine*

Kogan, M. & Rappaport, J. (2011). HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* **8**, 25.

- Kong, X., West, J. T., Zhang, H., Shea, D. M., M'soka, T. J. & Wood, C. (2008).** The human immunodeficiency virus type 1 envelope confers higher rates of replicative fitness to perinatally transmitted viruses than to nontransmitted viruses. *J Virol* **82**, 11609-11618.
- Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C. & Detours, V. (2001a).** Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* **58**, 19-42.
- Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C. & Detours, V. (2001b).** Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* **58**, 19-42.
- Kourtis, A. P., Bulterys, M., Nesheim, S. R. & Lee, F. K. (2001).** Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. *JAMA* **285**, 709-712.
- Kourtis, A. P., Butera, S., Ibegbu, C., Belec, L. & Duerr, A. (2003).** Breast milk and HIV-1: vector of transmission or vehicle of protection? *Lancet Infect Dis* **3**, 786-793.
- Kwiek, J. J., Mwapasa, V., Milner, D. A., Jr, Alker, A. P., Miller, W. C., Tadesse, E., Molyneux, M. E., Rogerson, S. J. & Meshnick, S. R. (2006).** Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Med* **3**, e10.
- Kwiek, J. J., Russell, E. S., Dang, K. K., Burch, C. L., Mwapasa, V., Meshnick, S. R. & Swanstrom, R. (2008).** The molecular epidemiology of HIV-1 envelope diversity during HIV-1 subtype C vertical transmission in Malawian mother-infant pairs. *AIDS* **22**, 863-871.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. (1998).** Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-659.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Majeed, S., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. (2000).** Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure* **8**, 1329-1339.
- Kwong, P. D., Doyle, M. L., Casper, D. J., Cicala, C., Leavitt, S. A., Majeed, S., Steenbeke, T. D., Venturi, M., Chaiken, I., & other authors. (2002).** HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-682.
- Kwong, P. D., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. (2009).** Mining the B cell repertoire for broadly neutralizing monoclonal antibodies to HIV-1. *Cell Host Microbe* **6**, 292-294.
- Kwong, P. D., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. (2011).** Rational Design of Vaccines to Elicit Broadly Neutralizing Antibodies to HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a007278.
- Labrijn, A. F., Poignard, P., Raja, A., Zwick, M. B., Delgado, K., Franti, M., Binley, J., Vivona, V., Grundner, C., & other authors. (2003).** Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**, 10557-10565.
- Labrosse, B., Treboute, C., Brelot, A. & Alizon, M. (2001).** Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. *J Virol* **75**, 5457-5464.
- Lagaye, S., Derrien, M., Menu, E., Coïto, C., Tresoldi, E., Maucière, P., Scarlatti, G., Chaouat, G., Barré-Sinoussi, F. & Bomsel, M. (2001).** Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* **75**, 4780-4791.
- Lallemant, M., Jourdain, G., Le Coeur, S., Mary, J. Y., Ngo-Giang-Huong, N., Koetsawang, S., Kanshana, S., McIntosh, K. & Thaineua, V. (2004).** Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *N Engl J Med* **351**, 217-228.
- Lamers, S. L., Sleasman, J. W., She, J. X., Barrie, K. A., Pomeroy, S. M., Barrett, D. J. & Goodenow, M. M. (1994).** Persistence of multiple maternal genotypes of human immunodeficiency virus type I in infants infected by vertical transmission. *J Clin Invest* **93**, 380-390.

LaRosa, G. J., Weinhold, K., Profy, A. T., Langlois, A. J., Dreesman, G. R., Boswell, R. N., Shadduck, P., Bolognesi, D. P., Matthews, T. J. & Emimi, E. A. (1991). Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant: further clarifications. *Science* **253**, 1146.

Lathey, J. L., Tsou, J., Brinker, K., Hsia, K., Meyer, W. A., 3rd & Spector, S. A. (1999). Lack of autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and macrophage tropism are associated with mother-to-infant transmission. *J Infect Dis* **180**, 344-350.

Lavine, C. L., Lao, S., Montefiori, D. C., Haynes, B. F., Sodroski, J. G., Yang, X. & the NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI). (2012). High-mannose glycan-dependent epitopes are frequently targeted in broad neutralizing antibody responses during infection of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **86**, 2153-2164.

Lehman, D. A. & Farquhar, C. (2007). Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev Med Virol* **17**, 381-403.

Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. & Gregory, T. J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**, 10373-10382.

Levin, J. G., Mitra, M., Mascarenhas, A. & Musier-Forsyth, K. (2010). Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol* **7**, 754-774.

Lewis, S. H., Reynolds-Kohler, C., Fox, H. E. & Nelson, J. A. (1990). HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* **335**, 565-568.

Li, B., Decker, J. M., Johnson, R. W., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Mulenga, J., Allen, S., Hunter, E., Hahn, B. H., & other authors. (2006a). Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**, 5211-5218.

Li, M., Salazar-Gonzalez, J. F., Derdeyn, C. A., Morris, L., Williamson, C., Robinson, J. E., Decker, J. M., Li, Y., Salazar, M. G., & other authors. (2006b). Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections in Southern Africa. *J Virol* **80**, 11776-11790.

Li, Y., Migueles, S. A., Welcher, B., Svehla, K., Phogat, A., Louder, M. K., Wu, X., Shaw, G. M., Connors, M., & other authors. (2007). Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* **13**, 1032-1034.

Li, Y., Svehla, K., Louder, M. K., Wycuff, D., Phogat, S., Tang, M., Migueles, S. A., Wu, X., Phogat, A., & other authors. (2009). Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **83**, 1045-1059.

Li, Y., O'Dell, S., Walker, L. M., Wu, X., Guenaga, J., Feng, Y., Schmidt, S. D., McKee, K., Louder, M. K., & other authors. (2011). Mechanism of neutralization by the broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibody VRC01. *J Virol* **85**, 8954-8967.

Liu, J., Bartsaghi, A., Borgnia, M. J., Sapiro, G. & Subramaniam, S. (2008). Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **455**, 109-113.

Liu, L., Cimbri, R., Lusso, P. & Berger, E. A. (2011a). Intraprotomer masking of third variable loop (V3) epitopes by the first and second variable loops (V1V2) within the native HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 20148-20153.

Liu, L., Wen, M., Wang, W., Wang, S., Yang, L., Liu, Y., Qian, M., Zhang, L., Shao, Y., & other authors. (2011b). Potent and broad anti-HIV-1 activity exhibited by a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored peptide derived from the CDR H3 of broadly neutralizing antibody PG16. *J Virol* **85**, 8467-8476.

Lobritz, M. A., Ratcliff, A. N. & Arts, E. J. (2010). HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses* **2**, 1069-1105.

Lohman-Payne, B., Slyker, J. & Rowland-Jones, S. L. (2010). Immune-based approaches to the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: active and passive immunization. *Clin Perinatol* **37**, 787-805, ix.

Loussert-Ajaka, I., Mandelbrot, L., Delmas, M. C., Bastian, H., Benifla, J. L., Farfara, I., de Vincenzi, I., Matheron, S., Simon, F. & Brun-Vezinet, F. (1997). HIV-1 detection in cervicovaginal secretions during pregnancy. *AIDS* **11**, 1575-1581.

Lucić, V., Förster, F. & Baumeister, W. (2005). Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem* **74**, 833-865.

Lu, K., Heng, X. & Summers, M. F. (2011). Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol* **410**, 609-633.

Lynch, J. B., Nduati, R., Blish, C. A., Richardson, B. A., Mabuka, J. M., Jalalian-Lechak, Z., John-Stewart, G. & Overbaugh, J. (2011a). The breadth and potency of passively acquired human immunodeficiency virus type 1-specific neutralizing antibodies do not correlate with the risk of infant infection. *J Virol* **85**, 5252-5261.

Lynch, R. M., Rong, R., Boliar, S., Sethi, A., Li, B., Mulenga, J., Allen, S., Robinson, J. E., Gnanakaran, S. & Derdeyn, C. A. (2011b). The B cell response is redundant and highly focused on V1V2 during early subtype C infection in a Zambian seroconverter. *J Virol* **85**, 905-915.

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

Mammano, F. & Labrosse, B. (2007). Evolution du tropisme des populations virales dans l'histoire naturelle de l'infection par le VIH. *Virologie* **11**, 95-106.

Mandelbrot, L., Le Chenadec, J., Berrebi, A., Bongain, A., Bénifla, J. L., Delfraissy, J. F., Blanche, S. & Mayaux, M. J. (1998). Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. *JAMA* **280**, 55-60.

Mandelbrot, L., Burgard, M., Teglas, J. P., Bénifla, J. L., Khan, C., Blot, P., Vilmer, E., Matheron, S., Firtion, G., & other authors. (1999). Frequent detection of HIV-1 in the gastric aspirates of neonates born to HIV-infected mothers. *AIDS* **13**, 2143-2149.

Mano, H. & Chermann, J. C. (1991a). Fetal human immunodeficiency virus type 1 infection of different organs in the second trimester. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 83-88.

Mano, H. & Chermann, J. C. (1991b). Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary cultured placental cells. *Res Virol* **142**, 95-104.

Manrique, A., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Kuster, H., Leemann, C., Niederöst, B., Weber, R., Stiegler, G., & other authors. (2007). In vivo and in vitro escape from neutralizing antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *J Virol* **81**, 8793-8808.

Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-5094.

Martinez, V., Diemert, M.-C., Braibant, M., Potard, V., Charuel, J.-L., Barin, F., Costagliola, D., Caumes, E., Clauvel, J.-P., & other authors. (2009). Anticardiolipin antibodies in HIV infection are independently associated with antibodies to the membrane proximal external region of gp41 and with cell-associated HIV DNA and immune activation. *Clin Infect Dis* **48**, 123-132.

Mascola, J. R., Lewis, M. G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T. C., Hayes, D., Louder, M. K., Brown, C. R., Sapan, C. V., & other authors. (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., & other authors. (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.

Mascola, J. R. (2003). Defining the protective antibody response for HIV-1. *Curr Mol Med* **3**, 209-216.

Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. (2003). HIV-1: nature's master of disguise. *Nat Med* **9**, 393-394.

Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* **28**, 413-444.

Mateu, M. G. (2009). The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J* **276**, 6098-6109.

McCutchan, F. E., Hegerich, P. A., Brennan, T. P., Phanuphak, P., Singharaj, P., Jugsudee, A., Berman, P. W., Gray, A. M., Fowler, A. K. & Burke, D. S. (1992). Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1887-1895.

McCutchan, F. E. (2006). Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* **78 Suppl 1**, S7-S12.

McIntosh, R., Nicastro, D. & Mastronarde, D. (2005). New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* **15**, 43-51.

McIntyre, J. (2006). Strategies to prevent mother-to-child transmission of HIV. *Curr Opin Infect Dis* **19**, 33-38.

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

McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **10**, 11-23.

Medina-Ramírez, M., Sánchez-Merino, V., Sánchez-Palomino, S., Merino-Mansilla, A., Ferreira, C. B., Pérez, I., González, N., Alvarez, A., Alcocer-González, J. M., & other authors. (2011). Broadly cross-neutralizing antibodies in HIV-1 patients with undetectable viremia. *J Virol* **85**, 5804-5813.

Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Manuelli, V., Jean-Pierre, P., Lopez, P., Shet, A., Low, A., Mohri, H., & other authors. (2007). Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **81**, 599-612.

Menu, E., Mbopi-Keou, F. X., Lagaye, S., Pissard, S., Maucière, P., Scarlatti, G., Martin, J., Goossens, M., Chaouat, G., & other authors. (1999). Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J Infect Dis* **179**, 44-51.

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

Mognetti, B., Moussa, M., Croitoru, J., Menu, E., Dormont, D., Roques, P. & Chaouat, G. (2000). HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates. *Clin Exp Immunol* **119**, 486-492.

Moir, S., Malaspina, A. & Fauci, A. S. (2011). Prospects for an HIV vaccine: leading B cells down the right path. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 1317-1321.

Montero, M., van Houten, N. E., Wang, X. & Scott, J. K. (2008). The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 54-84, table of contents.

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

Moore, P. L., Gray, E. S., Choge, I. A., Ranchobe, N., Mlisana, K., Abdool Karim, S. S., Williamson, C. & Morris, L. (2008). The c3-v4 region is a major target of autologous neutralizing antibodies in human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* **82**, 1860-1869.

Moore, P. L., Ranchobe, N., Lambson, B. E., Gray, E. S., Cave, E., Abrahams, M.-R., Bandawe, G., Mlisana, K., Abdool Karim, S. S., & other authors. (2009a). Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog* **5**, e1000598.

Moore, P. L., Gray, E. S. & Morris, L. (2009b). Specificity of the autologous neutralizing antibody response. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 358-363.

Moore, P. L., Gray, E. S., Sheward, D., Madiga, M., Ranchobe, N., Lai, Z., Honnen, W. J., Nonyane, M., Tumba, N., & other authors. (2011). Potent and broad neutralization of HIV-1 subtype C by plasma antibodies targeting a quaternary epitope including residues in the V2 loop. *J Virol* **85**, 3128-3141.

- Mostad, S. B. & Kreiss, J. K. (1996).** Shedding of HIV-1 in the genital tract. *AIDS* **10**, 1305-1315.
- Muriaux, D. & Darlix, J.-L. (2010).** Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol* **7**, 744-753.
- Murphy, E., Korber, B., Georges-Courbot, M. C., You, B., Pinter, A., Cook, D., Kieny, M. P., Georges, A., Mathiot, C. & Barré-Sinoussi, F. (1993).** Diversity of V3 region sequences of human immunodeficiency viruses type 1 from the central African Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 997-1006.
- Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rüker, F. & Katinger, H. (1993).** A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**, 6642-6647.
- Nabel, G. J., Kwong, P. D. & Mascola, J. R. (2011).** Progress in the rational design of an AIDS vaccine. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **366**, 2759-2765.
- Nakamura, K. J., Gach, J. S., Jones, L., Semrau, K., Walter, J., Bibollet-Ruche, F., Decker, J. M., Heath, L., Decker, W. D., & other authors. (2010).** 4E10-resistant HIV-1 isolated from four subjects with rare membrane-proximal external region polymorphisms. *PLoS ONE* **5**, e9786.
- Nandi, A., Lavine, C. L., Wang, P., Lipchina, I., Goepfert, P. A., Shaw, G. M., Tomaras, G. D., Montefiori, D. C., Haynes, B. F., & other authors. (2010).** Epitopes for broad and potent neutralizing antibody responses during chronic infection with human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **396**, 339-348.
- Neel, C., Etienne, L., Li, Y., Takehisa, J., Rudicell, R. S., Bass, I. N., Moudindo, J., Mebenga, A., Esteban, A., & other authors. (2010).** Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. *J Virol* **84**, 1464-1476.
- Ng, C. T., Jaworski, J. P., Jayaraman, P., Sutton, W. F., Delio, P., Kuller, L., Anderson, D., Landucci, G., Richardson, B. A., & other authors. (2010).** Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques. *Nat Med* **16**, 1117-1119.
- Nkengasong, J. N., Janssens, W., Heyndrickx, L., Fransen, K., Ndumbe, P. M., Motte, J., Leonaers, A., Ngolle, M., Ayuk, J. & Piot, P. (1994).** Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon. *AIDS* **8**, 1405-1412.
- Norrby, E., Biberfeld, G., Chiodi, F., von Gegerfeldt, A., Nauckler, A., Parks, E. & Lerner, R. (1987).** Discrimination between antibodies to HIV and to related retroviruses using site-directed serology. *Nature* **329**, 248-250.
- Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J. R., Wyatt, R. & Kwong, P. D. (2004).** Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* **78**, 10724-10737.
- Onafuwa-Nuga, A. & Telesnitsky, A. (2009).** The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 451-480, Table of Contents.
- Ou, C. Y., Takebe, Y., Luo, C. C., Kalish, M., Auwanit, W., Bandea, C., de la Torre, N., Moore, J. L., Schochetman, G. & Yamazaki, S. (1992).** Wide distribution of two subtypes of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1471-1472.
- Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y.-E. A., Chen, L., Huang, C.-chin, Kong, L., Kwon, Y. D., Stuckey, J., Zhou, T., & other authors. (2010a).** Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 1166-1171.
- Pancera, M., McLellan, J. S., Wu, X., Zhu, J., Changela, A., Schmidt, S. D., Yang, Y., Zhou, T., Phogat, S., & other authors. (2010b).** Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1. *J Virol* **84**, 8098-8110.

Pantophlet, R. & Burton, D. R. (2006). GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol* **24**, 739-769.

Parren, P. W., Ditzel, H. J., Gulizia, R. J., Binley, J. M., Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R. & Mosier, D. E. (1995). Protection against HIV-1 infection in hu-PBL-SCID mice by passive immunization with a neutralizing human monoclonal antibody against the gp120 CD4-binding site. *AIDS* **9**, F1-6.

Parren, P. W., Marx, P. A., Hessel, A. J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J. P. & 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.

Pasquier, C., Cayrou, C., Blancher, A., Tourne-Petheil, C., Berrebi, A., Tricoire, J., Puel, J. & Izopet, J. (1998). Molecular evidence for mother-to-child transmission of multiple variants by analysis of RNA and DNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 8493-8501.

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

Pejchal, R., Walker, L. M., Stanfield, R. L., Phogat, S. K., Koff, W. C., Poignard, P., Burton, D. R. & Wilson, I. A. (2010). Structure and function of broadly reactive antibody PG16 reveal an H3 subdomain that mediates potent neutralization of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 11483-11488.

Pejchal, R., Doores, K. J., Walker, L. M., Khayat, R., Huang, P.-S., Wang, S.-K., Stanfield, R. L., Julien, J.-P., Ramos, A., & other authors. (2011). A Potent and Broad Neutralizing Antibody Recognizes and Penetrates the HIV Glycan Shield. *Science (New York, NY)*.

Perrin, L., Kaiser, L. & Yerly, S. (2003). Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* **3**, 22-27.

Peterlin, B. M. & Trono, D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* **3**, 97-107.

Piantadosi, A., Chohan, B., Chohan, V., McClelland, R. S. & Overbaugh, J. (2007). Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* **3**, e177.

Piantadosi, A., Panteleeff, D., Blish, C. A., Baeten, J. M., Jaoko, W., McClelland, R. S. & 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.

Pietzsch, J., Scheid, J. F., Mouquet, H., Seaman, M. S., Broder, C. C. & Nussenzweig, M. C. (2010). Anti-gp41 antibodies cloned from HIV-infected patients with broadly neutralizing serologic activity. *J Virol* **84**, 5032-5042.

Pinter, A., Honnen, W. J., He, Y., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. & Kayman, S. C. (2004). The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* **78**, 5205-5215.

Pinter, A., Honnen, W. J., D'Agostino, P., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. & Kayman, S. C. (2005). The C108g epitope in the V2 domain of gp120 functions as a potent neutralization target when introduced into envelope proteins derived from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Virol* **79**, 6909-6917.

Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L. & Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**, 871-872.

Poignard, P., Sabbe, R., Picchio, G. R., Wang, M., Gulizia, R. J., Katinger, H., Parren, P. W., Mosier, D. E. & Burton, D. R. (1999). Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* **10**, 431-438.

Poignard, P., Saphire, E. O., Parren, P. W. & Burton, D. R. (2001). gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* **19**, 253-274.

Pope, M. & Haase, A. T. (2003). Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* **9**, 847-852.

Ramirez, B. C., Simon-Loriere, E., Galetto, R. & Negroni, M. (2008). Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Res* **134**, 64-73.

Raska, M. & Novak, J. (2010). Involvement of envelope-glycoprotein glycans in HIV-1 biology and infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**, 191-208.

Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A. & Baumeister, K. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284.

Renjifo, B., Chung, M., Gilbert, P., Mwakagile, D., Msamanga, G., Fawzi, W. & Essex, M. (2003). In-utero transmission of quasiespecies among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Virology* **307**, 278-282.

Requejo, H. I. Z. (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica* **40**, 331-345.

Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4144-4149.

Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernández-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**, 1949-1953.

Roben, P., Moore, J. P., Thali, M., Sodroski, J., Barbas, C. F., 3rd & Burton, D. R. (1994). Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 4821-4828.

Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., & other authors. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-56.

Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. & 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.

Roeth, J. F. & Collins, K. L. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 548-563.

Roitt, Y. & Rabson, A. (2002). Collection "Sciences fondamentales". Immunologie médicale - L'essentiel. Edition Maloine. p135.

Romani, B., Engelbrecht, S. & Glashoff, R. H. (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* **91**, 1-12.

Van Rompay, K. K., Otsyula, M. G., Tarara, R. P., Canfield, D. R., Berardi, C. J., McChesney, M. B. & Marthas, M. L. (1996). Vaccination of pregnant macaques protects newborns against mucosal simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **173**, 1327-1335.

Rong, R., Bibollet-Ruche, F., Mulenga, J., Allen, S., Blackwell, J. L. & Derdeyn, C. A. (2007a). Role of V1V2 and other human immunodeficiency virus type 1 envelope domains in resistance to autologous neutralization during clade C infection. *J Virol* **81**, 1350-1359.

Rong, R., Gnanakaran, S., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Taylor, J., Sfakianos, J. N., Mokili, J. L., Muldoon, M., Mulenga, J., & other authors. (2007b). Unique mutational patterns in the envelope alpha 2 amphipathic helix and acquisition of length in gp120 hypervariable domains are associated with resistance to autologous neutralization of subtype C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **81**, 5658-5668.

Rong, R., Li, B., Lynch, R. M., Haaland, R. E., Murphy, M. K., Mulenga, J., Allen, S. A., Pinter, A., Shaw, G. M., & other authors. (2009). Escape from autologous neutralizing antibodies in acute/early subtype C HIV-1 infection requires multiple pathways. *PLoS Pathog* **5**, e1000594.

Roux, K. H. & Taylor, K. A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 244-252.

Rouzioux, C., Costagliola, D., Burgard, M., Blanche, S., Mayaux, M. J., Griscelli, C. & Valleron, A. J. (1995). Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Am J Epidemiol* **142**, 1330-1337.

Ruprecht, R. M., Ferrantelli, F., Kitabwalla, M., Xu, W. & McClure, H. M. (2003). Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine* **21**, 3370-3373.

Rusert, P., Krarup, A., Magnus, C., Brandenberg, O. F., Weber, J., Ehlert, A.-K., Regoes, R. R., Günthard, H. F. & Trkola, A. (2011). Interaction of the gp120 V1V2 loop with a neighboring gp120 unit shields the HIV envelope trimer against cross-neutralizing antibodies. *J Exp Med* **208**, 1419-1433.

Russell, E. S., Kwiek, J. J., Keys, J., Barton, K., Mwapasa, V., Montefiori, D. C., Meshnick, S. R. & Swanstrom, R. (2011). The genetic bottleneck in vertical transmission of subtype C HIV-1 is not driven by selection of especially neutralization-resistant virus from the maternal viral population. *J Virol* **85**, 8253-8262.

Ryu, S. E., Kwong, P. D., Truneh, A., Porter, T. G., Arthos, J., Rosenberg, M., Dai, X. P., Xuong, N. H., Axel, R. & Sweet, R. W. (1990). Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* **348**, 419-426.

Sabin, C., Corti, D., Buzon, V., Seaman, M. S., Lutje Hulsik, D., Hinz, A., Vanzetta, F., Agatic, G., Silacci, C., & other authors. (2010). Crystal structure and size-dependent neutralization properties of HK20, a human monoclonal antibody binding to the highly conserved heptad repeat 1 of gp41. *PLoS Pathog* **6**, e1001195.

Safrit, J. T., Ruprecht, R., Ferrantelli, F., Xu, W., Kitabwalla, M., Van Rompay, K., Marthas, M., Haigwood, N., Mascola, J. R., & other authors. (2004). Immunoprophylaxis to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* **35**, 169-177.

Sagar, M., Wu, X., Lee, S. & Overbaugh, J. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J Virol* **80**, 9586-9598.

Samleerat, T., Braibant, M., Jourdain, G., Moreau, A., Ngo-Giang-Huong, N., Leechanachai, P., Hemvuttiphon, J., Hinjiranandana, T., Changchit, T., & other authors. (2008). Characteristics of HIV type 1 (HIV-1) glycoprotein 120 env sequences in mother-infant pairs infected with HIV-1 subtype CRF01_AE. *J Infect Dis* **198**, 868-876.

Samleerat, T., Thenin, S., Jourdain, G., Ngo-Giang-Huong, N., Moreau, A., Leechanachai, P., Ithisuknanth, J., Pagdi, K., Wannarit, P., & other authors. (2009). Maternal neutralizing antibodies against a CRF01_AE primary isolate are associated with a low rate of intrapartum HIV-1 transmission. *Virology* **387**, 388-394.

Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D. & Moore, J. P. (2002). The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**, 7293-7305.

Saphire, E. O., Parren, P. W., Pantophlet, R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Stanfield, R. L., Burton, D. R. & Wilson, I. A. (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**, 1155-1159.

Sather, D. N., Armann, J., Ching, L. K., Mavrantoni, A., Sellhorn, G., Caldwell, Z., Yu, X., Wood, B., Self, S., & other authors. (2009). Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **83**, 757-769.

Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Rudd, P. M. & Burton, D. R. (2002). The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**, 7306-7321.

Scanlan, C. N., Offer, J., Zitzmann, N. & Dwek, R. A. (2007). Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **446**, 1038-1045.

Scarlatti, G. (1996). Paediatric HIV infection. *Lancet* **348**, 863-868.

Scarlatti, G. (2004). Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries. *AIDS Rev* **6**, 67-78.

Scarlatti, G., Leitner, T., Halapi, E., Wahlberg, J., Marchisio, P., Clerici-Schoeller, M. A., Wigzell, H., Fenyő, E. M., Albert, J. & Uhlén, M. (1993a). Comparison of variable region 3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 from infected children with the RNA and DNA sequences of the virus populations of their mothers. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1721-1725.

Scarlatti, G., Albert, J., Rossi, P., Hodara, V., Biraghi, P., Muggiasca, L. & Fenyő, E. M. (1993b). Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. *J Infect Dis* **168**, 207-210.

Scheid, J. F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M. S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R. G., Anthony, R. M., Zebroski, H., & other authors. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**, 636-640.

Scheid, J. F., Mouquet, H., Ueberheide, B., Diskin, R., Klein, F., Oliveira, T. Y. K., Pietzsch, J., Fenyő, D., Abadir, A., & other authors. (2011). Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**, 1633-1637.

Schief, W. R., Ban, Y.-E. A. & Stamatatos, L. (2009). Challenges for structure-based HIV vaccine design. *Curr Opin HIV AIDS* **4**, 431-440.

Shang, H., Han, X., Shi, X., Zuo, T., Goldin, M., Chen, D., Han, B., Sun, W., Wu, H., & other authors. (2011). Genetic and neutralization sensitivity of diverse HIV-1 env clones from chronically infected patients in China. *J Biol Chem* **286**, 14531-14541.

Shattock, R. J. & Moore, J. P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* **1**, 25-34.

Shen, X., Parks, R. J., Montefiori, D. C., Kirchherr, J. L., Keele, B. F., Decker, J. M., Blattner, W. A., Gao, F., Weinhold, K. J., & other authors. (2009). In vivo gp41 antibodies targeting the 2F5 monoclonal antibody epitope mediate human immunodeficiency virus type 1 neutralization breadth. *J Virol* **83**, 3617-3625.

Shibata, J., Yoshimura, K., Honda, A., Koito, A., Murakami, T. & Matsushita, S. (2007). Impact of V2 mutations on escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* **81**, 3757-3768.

Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M. W. & 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.

Shioda, T., Levy, J. A. & Cheng-Mayer, C. (1992). Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9434-9438.

Shi, W., Bohon, J., Han, D. P., Habte, H., Qin, Y., Cho, M. W. & Chance, M. R. (2010). Structural characterization of HIV gp41 with the membrane-proximal external region. *J Biol Chem* **285**, 24290-24298.

Simek, M. D., Rida, W., Priddy, F. H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D. S., Lehrman, J. K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., & other authors. (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.

Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barré-Sinoussi, F. & Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**, 1032-1037.

Smith, D. M., Strain, M. C., Frost, S. D. W., Pillai, S. K., Wong, J. K., Wrin, T., Liu, Y., Petropoulos, C. J., Daar, E. S., & other authors. (2006). Lack of neutralizing antibody response to HIV-1 predisposes to superinfection. *Virology* **355**, 1-5.

Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D. R. & Mascola, J. R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* **15**, 866-870.

Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F. & Gallo, R. C. (1986). Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**, 637-648.

Subramaniam, S. (2006). The SIV surface spike imaged by electron tomography: one leg or three? *PLoS Pathog* 2, e91.²

Tagliamonte, M., Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M. & Buonaguro L. (2011). Conformational HIV-1 envelope on particulate structures: a tool for chemokine coreceptor binding studies. *J Transl Med* 9 Suppl1, S1.

Takehisa, J., Kraus, M. H., Ayouba, A., Bailes, E., Van Heuverswyn, F., Decker, J. M., Li, Y., Rudicell, R. S., Learn, G. H., & other authors. (2009). Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J Virol* 83, 1635-1648.

Tang, H., Robinson, J. E., Gnanakaran, S., Li, M., Rosenberg, E. S., Perez, L. G., Haynes, B. F., Liao, H.-X., Labranche, C. C., & other authors. (2011). epitopes immediately below the base of the V3 loop of gp120 as targets for the initial autologous neutralizing antibody response in two HIV-1 subtype B-infected individuals. *J Virol* 85, 9286-9299.

Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S. & Lu, M. (1997). Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12303-12308.

Tardif, M. R. & Tremblay, M. J. (2005). LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4⁺ T cells by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 79, 13714-13724.

Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E. & Hammer, S. M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 358, 1590-1602.

Tebit, D. M. & Arts, E. J. (2011). Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* 11, 45-56.

The European Mode of Delivery Collaboration. (1999). Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet* 353, 1035-1039.

Thenin, S., Samleerat, T., Tavernier, E., Ngo-Giang-Huong, N., Jourdain, G., Lallemand, M., Barin, F. & Braibant, M. (2012). Envelope glycoproteins of Human Immunodeficiency Virus type 1 variants issued from mother-infant pairs display a wide spectrum of biological properties. *Virology*

Thorne, C. & Newell, M.-L. (2003). Mother-to-child transmission of HIV infection and its prevention. *Curr HIV Res* 1, 447-462.

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., & other authors. (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., Binley, J. M., Gray, E. S., Crooks, E. T., Osawa, K., Moore, P. L., Tumba, N., Tong, T., Shen, X., & other authors. (2011). Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. *J Virol* 85, 11502-11519.

Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J. P. & Katinger, H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70, 1100-1108.

Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., & other authors. (2005). Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* 11, 615-622.

Tsegaye, T. S. & Pöhlmann, S. (2010). The multiple facets of HIV attachment to dendritic cell lectins. *Cell Microbiol* 12, 1553-1561.

Turner, B. G. & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285, 1-32.

Utachee, P., Nakamura, S., Isarangkura-Na-Ayuthaya, P., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W. & Kameoka, M. (2010). Two N-linked glycosylation sites in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for the CD4 binding domain. *J Virol* 84, 4311-4320.

- van Gils, M. J., Euler, Z., Schweighardt, B., Wrin, T. & Schuitemaker, H. (2009).** Prevalence of cross-reactive HIV-1-neutralizing activity in HIV-1-infected patients with rapid or slow disease progression. *AIDS* **23**, 2405-2414.
- van Gils, M. J., Bunnik, E. M., Burger, J. A., Jacob, Y., Schweighardt, B., Wrin, T. & Schuitemaker, H. (2010).** Rapid escape from preserved cross-reactive neutralizing humoral immunity without loss of viral fitness in HIV-1-infected progressors and long-term nonprogressors. *J Virol* **84**, 3576-3585.
- van Gils, M. J., Bunnik, E. M., Boeser-Nunnink, B. D., Burger, J. A., Terlouw-Klein, M., Verwer, N. & Schuitemaker, H. (2011a).** Longer V1V2 region with increased number of potential N-linked glycosylation sites in the HIV-1 envelope glycoprotein protects against HIV-specific neutralizing antibodies. *J Virol* **85**, 6986-6995.
- van Gils, M. J., Edo-Matas, D., Bowles, E. J., Burger, J. A., Stewart-Jones, G. B. & Schuitemaker, H. (2011b).** Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in a patient with cross-reactive neutralizing activity in serum. *J Virol* **85**, 8443-8448.
- Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., & other authors. (2006).** Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**, 164.
- Verhofstede, C., Demecheleer, E., De Cabooter, N., Gaillard, P., Mwanyumba, F., Claeys, P., Chohan, V., Mandaliya, K., Temmerman, M. & Plum, J. (2003).** Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env sequence after vertical transmission in mother-child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J Virol* **77**, 3050-3057.
- Vidal, N., Mulanga, C., Bazepeo, S. E., Lepira, F., Delaporte, E. & Peeters, M. (2006).** Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 182-187.
- Vidricaire, G., Gauthier, S. & Tremblay, M. J. (2007).** HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 Interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans. *J Infect Dis* **195**, 1461-1471.
- Vidricaire, G., Tardif, M. R. & Tremblay, M. J. (2003).** The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Biol Chem* **278**, 15832-15841.
- Vidricaire, G., Imbeault, M. & Tremblay, M. J. (2004).** Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol* **78**, 11904-11915.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. & Alizon, M. (1985).** Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**, 9-17.
- Walker, L. M. & Burton, D. R. (2010).** Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr Opin Immunol* **22**, 358-366.
- Walker, L. M., Phogat, S. K., Chan-Hui, P.-Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J. L., Wrin, T., Simek, M. D., Fling, S., & other authors. (2009).** Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285-289.
- Walker, L. M., Simek, M. D., Priddy, F., Gach, J. S., Wagner, D., Zwick, M. B., Phogat, S. K., Poignard, P. & Burton, D. R. (2010).** A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog* **6**, e1001028.
- Walker, L. M., Huber, M., Doores, K. J., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J.-P., Wang, S.-K., Ramos, A., Chan-Hui, P.-Y., & other authors. (2011).** Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466-470.
- Weber, J. (2001).** The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull* **58**, 61-72.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1997).** Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.

Weiss, R. A., Clapham, P. R., Weber, J. N., Dalgleish, A. G., Lasky, L. A. & Berman, P. W. (1986). Variable and conserved neutralization antigens of human immunodeficiency virus. *Nature* **324**, 572-575.

Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., & other authors. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-312.

White, T. A., Bartesaghi, A., Borgnia, M. J., Meyerson, J. R., de la Cruz, M. J. V., Bess, J. W., Nandwani, R., Hoxie, J. A., Lifson, J. D., & other authors. (2010). Molecular architectures of trimeric SIV and HIV-1 envelope glycoproteins on intact viruses: strain-dependent variation in quaternary structure. *PLoS Pathog* **6**, e1001249.

White, T. A., Bartesaghi, A., Borgnia, M. J., de la Cruz, M. J. V., Nandwani, R., Hoxie, J. A., Bess, J. W., Lifson, J. D., Milne, J. L. S. & Subramaniam, S. (2011). Three-dimensional structures of soluble CD4-bound states of trimeric simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins determined by using cryo-electron tomography. *J Virol* **85**, 12114-12123.

Wiley, R. L., Rutledge, R. A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C. E. & Martin, M. A. (1986). Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 5038-5042.

Wolinsky, S. M., Wike, C. M., Korber, B. T., Hutto, C., Parks, W. P., Rosenblum, L. L., Kunstman, K. J., Furtado, M. R. & Muñoz, J. L. (1992). Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* **255**, 1134-1137.

Wolk, T. & Schreiber, M. (2006). N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization. *Med Microbiol Immunol* **195**, 165-172.

Wu, H., Kwong, P. D. & Hendrickson, W. A. (1997). Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* **387**, 527-530.

Wu, L. & KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **6**, 859-868.

Wu, S.-R., Löving, R., Lindqvist, B., Hebert, H., Koeck, P. J. B., Sjöberg, M. & Garoff, H. (2010a). Single-particle cryoelectron microscopy analysis reveals the HIV-1 spike as a tripod structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 18844-18849.

Wu, X., Parast, A. B., Richardson, B. A., Nduati, R., John-Stewart, G., Mbori-Ngacha, D., Rainwater, S. M. J. & Overbaugh, J. (2006). Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant. *J Virol* **80**, 835-844.

Wu, X., Zhou, T., O'Dell, S., Wyatt, R. T., Kwong, P. D. & Mascola, J. R. (2009). Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 resistance to monoclonal antibody B12 that effectively targets the site of CD4 attachment. *J Virol* **83**, 10892-10907.

Wu, X., Yang, Z.-Y., Li, Y., Hogerthorp, C.-M., Schief, W. R., Seaman, M. S., Zhou, T., Schmidt, S. D., Wu, L., & other authors. (2010b). Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**, 856-861.

Wu, X., Zhou, T., Zhu, J., Zhang, B., Georgiev, I., Wang, C., Chen, X., Longo, N. S., Louder, M., & other authors. (2011a). Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* **333**, 1593-1602.

Wu, X., Changela, A., O'Dell, S., Schmidt, S. D., Pancera, M., Yang, Y., Zhang, B., Gorny, M. K., Phogat, S., & other authors. (2011b). Immunotypes of a quaternary site of HIV-1 vulnerability and their recognition by antibodies. *J Virol* **85**, 4578-4585.

Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888.

Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711.

Zachar, V., Zacharova, V., Fink, T., Thomas, R. A., King, B. R., Ebbesen, P., Jones, T. B. & Goustin, A. S. (1999). Genetic analysis reveals ongoing HIV type 1 evolution in infected human placental trophoblast. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 1673-1683.

Zanetti, G., Briggs, J. A. G., Grünewald, K., Sattentau, Q. J. & Fuller, S. D. (2006). Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog* **2**, e83.

Zhang, H., Tully, D. C., Hoffmann, F. G., He, J., Kankasa, C. & Wood, C. (2010a). Restricted genetic diversity of HIV-1 subtype C envelope glycoprotein from perinatally infected Zambian infants. *PLoS ONE* **5**, e9294.

Zhang, H., Rola, M., West, J. T., Tully, D. C., Kubis, P., He, J., Kankasa, C. & Wood, C. (2010b). Functional properties of the HIV-1 subtype C envelope glycoprotein associated with mother-to-child transmission. *Virology* **400**, 164-174.

Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. & Korber, B. (2004). Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* **14**, 1229-1246.

Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessel, A. J., Van Ryk, D., Xiang, S.-H., Yang, X., Zhang, M.-Y., Zwick, M. B., & other authors. (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* **445**, 732-737.

Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.-Y., Dai, K., Finzi, A., Kwon, Y. D., Scheid, J. F., Shi, W., & other authors. (2010). Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* **329**, 811-817.

Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr, Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 15812-15817.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr, Chertova, E., Lifson, J. D., Grisé, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847-852.

Zhu, P., Winkler, H., Chertova, E., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2008). Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs. *PLoS Pathog* **4**, e1000203.

Zolla-Pazner, S. (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* **4**, 199-210.

Zolla-Pazner, S. & Cardozo, T. (2010). Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat Rev Immunol* **10**, 527-535.

Zolla-Pazner, S., Cohen, S. S., Krachmarov, C., Wang, S., Pinter, A. & Lu, S. (2008). Focusing the immune response on the V3 loop, a neutralizing epitope of the HIV-1 gp120 envelope. *Virology* **372**, 233-246.

Zolla-Pazner, S., Cohen, S., Pinter, A., Krachmarov, C., Wrin, T., Wang, S. & Lu, S. (2009). Cross-clade neutralizing antibodies against HIV-1 induced in rabbits by focusing the immune response on a neutralizing epitope. *Virology* **392**, 82-93.

Zolla-Pazner, S., Kong, X.-P., Jiang, X., Cardozo, T., Nádas, A., Cohen, S., Totrov, M., Seaman, M. S., Wang, S. & Lu, S. (2011). Cross-clade HIV-1 neutralizing antibodies induced with V3-scaffold protein immunogens following priming with gp120 DNA. *J Virol* **85**, 9887-9898.

Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., & other authors. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**, 10892-10905.

Zwick, M. B., Parren, P. W. H. I., Saphire, E. O., Church, S., Wang, M., Scott, J. K., Dawson, P. E., Wilson, I. A. & Burton, D. R. (2003). Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **77**, 5863-5876.

Zwick, M. B., Jensen, R., Church, S., Wang, M., Stiegler, G., Kunert, R., Katinger, H. & Burton, D. R. (2005). Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* **79**, 1252-1261.

Transmission mère-enfant du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 : rôle des anticorps neutralisants maternels et propriétés biologiques des virus transmis

Résumé

La transmission mère-enfant (TME) est un modèle naturel permettant d'explorer le rôle des anticorps neutralisants dans la protection vis-à-vis de l'infection par le VIH-1 ainsi que les caractéristiques des virus transmis aux enfants malgré la présence d'anticorps maternels. Au cours de mes travaux, nous avons confirmé l'importance de la région V2 de la glycoprotéine de surface (gp120) du VIH-1 dans la résistance du virus à la neutralisation. L'analyse des propriétés de variants transmis à l'enfant et de variants maternels a mis en évidence une grande hétérogénéité de leurs propriétés biologiques sans pour autant identifier de propriétés spécifiques conférant un avantage sélectif aux virus transmis. Cependant, nous avons montré que les virus transmis étaient plus sensibles à la neutralisation par deux anticorps monoclonaux humains largement neutralisants récemment identifiés, PG9 et PG16, une observation qui pourrait avoir des applications intéressantes en termes de prévention de la TME ou de développement vaccinal. Enfin, nous avons identifié deux résidus très conservés de la gp120 impliqués dans la sensibilité à la neutralisation par PG9 et/ou PG16.

Mots clés : VIH-1, transmission mère-enfant, anticorps neutralisants, glycoprotéines d'enveloppe

Abstract

Mother-to-child transmission (MTCT) provides a natural model for studying the role of neutralizing antibodies in preventing HIV-1 infection, and the characteristics of the virus transmitted to the infants despite the presence of maternal antibodies. During my thesis works, we confirmed that the V2 domain of the surface envelope glycoprotein (gp120) of HIV-1 plays a major role in resistance to neutralization. The analysis of properties of variants transmitted to infant and maternal variants showed a wide spectrum of their biological properties, but we did not identify any specific property conferring a selective advantage for transmission of the virus to the infant. Nevertheless, we showed that the transmitted variants were more sensitive to neutralization by the two recently described broadly neutralizing monoclonal antibodies PG9 and PG16. This observation should have interesting applications in terms of prevention of MTCT or vaccine development. Finally, we identified two gp120 cross-clade conserved residues involved in neutralization sensitivity to PG9 and/or PG16.

Keywords: HIV-1, mother-to-child transmission, neutralizing antibodies, envelope glycoproteins