

**THESE**

pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2**

**Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

**« Sciences, Technologie, Santé »  
Mention : Microbiologie**

Présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 2010

par

**Estibaliz LAZARO**

Née le 9 Octobre 1974 à Bayonne

Sous la direction du Pr Hervé Fleury

**IMPACT DU SOUS-TYPE VIRAL ET DE L'APPRÊTEMENT  
ANTIGENIQUE SUR LA PRESENTATION DES EPITOPES DU VIH-1  
PAR LES MOLECULES HLA DE CLASSE I**

**Membres du Jury :**

|                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>M. Jean-François Moreau</b> , Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2    | Président  |
| <b>M<sup>me</sup> Laurence Weiss</b> , Professeur à l'Université René Descartes Paris V | Rapporteur |
| <b>M<sup>me</sup> Martine Peeters</b> , Directeur de Recherche UMR145 Montpellier       | Rapporteur |
| <b>M. François Simon</b> , Professeur à l'Université Denis Diderot Paris VII            | Examineur  |
| <b>M. Hervé Fleury</b> , Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2            | Directeur  |

**Membre Invité :**

**M. Jean-Luc Pellegrin**, Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2

## Remerciements

*A Monsieur le Professeur Hervé Fleury,  
Messieurs les Professeurs Jean-Luc Pellegrin et Jean-François Moreau,  
Madame le Professeur Laurence Weiss et Monsieur le Professeur François Simon  
qui nous font l'honneur de siéger au Jury de cette thèse.*

*A Madame le Docteur Martine Peeters  
qui a accepté de juger ce travail.*

*A Madame le Professeur Sylvie Le Gall qui m'a accueillie dans son équipe.*

## LISTE DES PUBLICATIONS

*Sequences of clustered epitopes in Gag and Nef potentially presented by predominant class I human leukocyte antigen (HLA) alleles A and B expressed by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients in Vietnam.*

Estibaliz Lazaro, Ioannis Theodorou, Elisabeth Legrand, Patricia Recordon-Pinson, Sebastien Boucher, Corinne Capoulade, Thi Hoang Lan, Pham Van Hung, Patrice Debre, Herve Fleury  
AIDS Research and Human Retroviruses 2005 ; 21 :586-91

*Molecular characterization of HIV-1 CRF01\_AE in Mekong delta, Vietnam, and impact of T-cell epitope mutations on HLA recognition (ANRS 12159).*

Estibaliz Lazaro\*, Luong Thu Tram\*, Pantxika Bellecave, Gwenda-Line Guidicelli, Guerric Anies, Huynh Hoang Khanh Thu, Marie Pillot Debelleix, Muriel Vray, Patricia Recordon-Pinson, Jean-Luc Taupin, Truong Thi Xuan Lien, Herve Fleury  
Plos One, submitted

*Differential HIV epitope processing in Monocytes and CD4T cells affects Cytotoxic Lymphocyte Recognition.*

Estibaliz Lazaro, Sasha Blue Godfrey, Pamela Stamegna, Tobi Ogbichie, Christopher Kerrigan, Mei Zhang, Bruce D. Walker, Sylvie Le Gall.  
The Journal of Infectious Diseases 2009 ;200 :236-43

# TABLE DES MATIERES

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b> | <b>6</b> |
|---------------------------|----------|

## **1<sup>ERE</sup> PARTIE :**

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>REPONSE CTL AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 : GENERALITES.....</b> | <b>10</b> |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 1. Qualité de la réponse CTL.....                     | 11 |
| 2. Avidité fonctionnelle.....                         | 12 |
| 3. Facteurs de Régulation.....                        | 13 |
| 3.1.CTLA-4 et PD-1.....                               | 13 |
| 3.2.Lymphocytes T Régulateurs.....                    | 15 |
| 4. Facteurs génétiques.....                           | 17 |
| 5. Evaluation de la réponse CTL.....                  | 20 |
| 5.1.ELISpot.....                                      | 20 |
| 5.2.Tests de Lyse cellulaire.....                     | 21 |
| 5.3.Utilisation des tétramères.....                   | 22 |
| 5.4.Tests d'inhibition de la réplication virale ..... | 23 |
| 6. Conclusion.....                                    | 24 |

## **2<sup>EME</sup> PARTIE :**

|                                                                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CARACTERISATION MOLECULAIRE DU VIH-1 CRF01_AE AU VIETNAM ET ANALYSE DE L'IMPACT DES MUTATIONS DE POLYMORPHISME SUR LEUR AFFINITE POUR LES MOLECULES HLA DE CLASSE I.....</b> | <b>25</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Epidémiologie du VIH-1 en Asie.....                                                                               | 27 |
| 1.1.Généralités.....                                                                                                 | 27 |
| 1.2.Cas du Vietnam.....                                                                                              | 28 |
| 2. Impact du polymorphisme du HLA de classe I sur la variabilité du VIH-1.....                                       | 29 |
| 3. Impact de la diversité du VIH-1 sur le pronostic de la maladie, les traitements et les stratégies vaccinales..... | 31 |

|                                                                                                             |                                                                                                              |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.                                                                                                        | Impact sur le pronostic de la maladie .....                                                                  | 31        |
| 3.2.                                                                                                        | Impact sur les antirétroviraux.....                                                                          | 33        |
| 3.3.                                                                                                        | Impact sur les stratégies vaccinales.....                                                                    | 34        |
| 4.                                                                                                          | Présentation du projet Vietnam.....                                                                          | 36        |
| 4.1.                                                                                                        | Séquençage et polymorphisme intra-épitopique de souches VIH-1 de Ho Chi Minh<br>Ville <sup>1</sup> .....     | 37        |
| 4.2.                                                                                                        | Projet ANRS 12159 et impact du polymorphisme sur la reconnaissance par les<br>molécules HLA de classe I..... | 39        |
| <br><b>3<sup>EME</sup> PARTIE :</b>                                                                         |                                                                                                              |           |
| <b>IMPACT DE L'APPRETEMENT ANTIGENIQUE SUR LA REPONSE CTL AU COURS DE<br/>L'INFECTION PAR LE VIH-1.....</b> |                                                                                                              | <b>44</b> |
| 1.                                                                                                          | Les étapes de l'apprêtement antigénique.....                                                                 | 46        |
| 1.1.                                                                                                        | Présentation Générale.....                                                                                   | 47        |
| 1.2.                                                                                                        | Le système ubiquitine-protéasome.....                                                                        | 50        |
| 1.3.                                                                                                        | Apprêtement antigénique post-protéasome.....                                                                 | 52        |
| 1.4.                                                                                                        | Destruction des peptides antigéniques et de leurs précurseurs.....                                           | 53        |
| 2.                                                                                                          | Modulation de la réponse CTL selon l'apprêtement antigénique.....                                            | 53        |
| 2.1.                                                                                                        | Impact de l'IFN $\gamma$ sur l'apprêtement antigénique.....                                                  | 53        |
| 2.2.                                                                                                        | Modification du contenu en protéasome et/ou peptidases.....                                                  | 55        |
| 2.3.                                                                                                        | Présence de mutations intra ou extra-épitopiques retentissant sur l'apprêtement..                            | 56        |
| 2.4.                                                                                                        | Stabilité des épitopes intra-cellulaires.....                                                                | 58        |
| 3.                                                                                                          | Qualité de l'apprêtement antigénique au cours de l'infection par le VIH.....                                 | 58        |
| 3.1.                                                                                                        | Impact du type cellulaire infecté par le VIH-1.....                                                          | 58        |
| 3.2.                                                                                                        | Impact de la stabilité intracellulaire des épitopes.....                                                     | 62        |
| <br><b>CONCLUSION.....</b>                                                                                  |                                                                                                              | <b>80</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>                                                                                   |                                                                                                              | <b>82</b> |
| <b>ANNEXES.....</b>                                                                                         |                                                                                                              | <b>89</b> |

## INTRODUCTION

En 2010 l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) reste un enjeu de santé publique considérable avec, selon les derniers chiffres de l'OMS, 33,4 millions de personnes actuellement infectées soit près de 60 millions de cas depuis le début de l'épidémie (dont près de la moitié sont décédés)<sup>2</sup>. Bien que les thérapeutiques anti-retrovirales aient transformé le pronostic des patients, elles restent inaccessibles pour le  $\frac{3}{4}$  des patients vivant dans les pays en voie de développement. L'urgence d'obtenir un vaccin efficace reste donc d'actualité et implique une connaissance précise des mécanismes de réponse immunitaire impliqués dans le contrôle de l'infection par le VIH.

La réponse lymphocytaire T CD8 + cytotoxique (CTL) joue un rôle immunitaire fondamental au cours des infections virales dont le VIH. Cela a été clairement établi dans le modèle animal. Chez le macaque infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), la perfusion d'anticorps anti-CD8 en phase aigue ou chronique de la maladie se manifeste par un rebond virologique conjointement à la perte de la réponse CTL<sup>3</sup>.

Les acteurs principaux de cette réponse CTL sont les épitopes viraux, issus de l'apprêtement antigénique, leur affinité pour les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) et le TCR (T Cell Receptor), et les facteurs de régulation de cette réponse lymphocytaire T CD8 (PD-1, CTLA-4, etc...). Une variabilité ou modification de l'un de ces facteurs peut avoir un impact significatif sur la réponse CTL et le pronostic de la maladie VIH.

Chez l'homme, les études génétiques récentes réalisées sur génome entier ont souligné le rôle majeur des molécules HLA et notamment du HLA-B\*57 dans le

contrôle de l'infection<sup>4,5</sup>. Chez ces patients dits contrôleurs, les réponses lymphocytaires T CD8+ ont un profil polyfonctionnel<sup>6</sup> et sont majoritairement dirigées contre des épitopes de *Gag*, séquence fortement conservée et précocement immunogène. Ces réponses CTL spécifiques dirigées contre des épitopes de *Gag* induisent des mutations d'échappement qui impactent sur la capacité répliquative du virus<sup>7</sup>.

La réponse CTL peut être atténuée par les lymphocytes T régulateurs et l'expression de certaines protéines telles que PD-1 (programmed cell death 1) ou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), cibles thérapeutiques immunogènes potentielles<sup>8</sup>.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur 2 facteurs possiblement impliqués dans la variabilité de la réponse CTL :

- L'impact des mutations de polymorphisme au sein des sous-types viraux sur l'affinité pour les molécules HLA de classe I,
- L'impact de l'apprêtement antigénique sur la réponse CTL.

L'extrême variabilité du VIH-1 constitue en effet un frein considérable à la mise au point d'un vaccin destiné à de larges populations au profil génétique et virologique hétérogène. Nous nous sommes intéressés au Vietnam, pays dans lequel l'infection par le VIH-1 a connu un développement exponentiel depuis les premiers cas rapportés à Ho Chi Minh Ville en 1990. De façon étonnante, la forme recombinante CRF01\_AE y prédomine largement et ce malgré un brassage perpétuel de populations<sup>1,9,10</sup>.

Dans un travail préliminaire, nous avons étudié le polymorphisme viral au sein de Gag et de Nef de 28 souches de VIH-1 de type CRF01-AE issues de patients vietnamiens (Ho Chi Minh Ville). Nous avons évalué l'impact des mutations intra-épitopiques sur l'affinité HLA selon le typage HLA-A et B déterminé chez les patients. Des régions pluri-épitopiques riches en épitopes ciblés par des allèles HLA spécifiques de cette population asiatique ont pu être définies. Ces travaux publiés sont présentés en annexe 1<sup>1</sup>.

Ils ont ensuite été prolongés d'une analyse plus exhaustive réalisée sur 125 patients séropositifs pour le VIH-1 recrutés au Vietnam dans 5 villes situées autour du delta du Mekong. Le séquençage viral a comporté Gag, RT, Env et Prot. Le typage HLA de classe I a été déterminé pour l'ensemble des patients. Cette étude nous a permis de définir le degré de consensus des séquences comparativement à la souche HxB2, d'établir une séquence consensus CRF01\_AE et de faire une cartographie virale identifiant les zones de polymorphisme. Ce travail descriptif a conduit à une partie analytique identifiant la variabilité des épitopes optimaux au sein des souches CRF01-AE et l'impact de cette variabilité sur la réponse CTL à partir des scores prédictifs définis par la base de données IEDB (<http://www.immuneepitope.org/>). Nous avons montré que les mutations de polymorphisme sont responsables, au sein de cette population asiatique, d'une diminution d'affinité pour les molécules HLA de classe I et donc d'un possible échappement immunitaire. Cela pourrait expliquer la prédominance et la propagation rapide du CRF01\_AE en Asie du Sud-Est. Ce travail est soumis à Plos One et devra être confirmé dans un second temps par une analyse *in vitro* de l'impact des mutations de polymorphisme sur la réponse CTL.

L'évaluation de la réponse lymphocytaire T se fait classiquement par la technique ELISpot qui mesure la quantité de cytokine sécrétée par les CTL en présence de

l'antigène peptidique. Ce type d'essai reste très artificiel dans le sens où les doses de peptides synthétiques sont supraphysiologiques. Par ailleurs, il ne tient pas compte des phénomènes survenant en amont de la réponse CTL, particulièrement l'apprêtement antigénique à l'origine de la synthèse des épitopes susceptibles d'induire une réponse immunitaire à partir de la dégradation protéique. Cette étape fait intervenir le protéasome, les amino peptidases et la tripeptidyl peptidase II. L'impact de l'apprêtement sur la réponse CTL a déjà été montré<sup>11,12</sup>. Cependant, l'intensité de ce processus catalytique n'a pas été identifiée selon le type cellulaire. Nous avons focalisé notre travail sur l'impact de l'apprêtement antigénique sur la réponse CTL au sein de 2 types cellulaires classiquement infectés par le VIH, les monocytes et les lymphocytes T CD4 (LT4). Nos résultats montrent que les monocytes sont dotés d'un apprêtement antigénique plus efficient ce qui conduit à une réponse CTL plus intense, comparativement aux LT4. Ces travaux publiés dans « The Journal of Infectious diseases » sont présentés annexe 2<sup>13</sup>.

Ils ont été poursuivis par une étude de la demi-vie intracellulaire des épitopes optimaux dans l'hypothèse qu'elle pouvait impacter elle aussi sur la réponse CTL. Les résultats préliminaires montrent que la structure biochimique des épitopes détermine leur stabilité intracellulaire et que la modulation de cette stabilité retentit sur la réponse CTL. Ces travaux sont en cours de publication.

## **1ere PARTIE**

### **REPONSE CTL AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 :**

#### **GENERALITES**

##### **INTRODUCTION**

La réponse lymphocytaire T CD8+ (CTL) est la principale réponse immunitaire effectrice au cours de l'infection par le VIH-1. Elle agit par 3 mécanismes principaux :

- Production d'interféron gamma (IFN $\gamma$ )
- Lyse de la cellule infectée par le biais de l'interaction Fas-Fas ligand
- Action de perforine et granzymes.

Plusieurs arguments forts plaident pour le rôle essentiel de cette réponse CTL au cours de l'infection par le VIH-1. Celle-ci apparaît en phase aiguë parallèlement à la décroissance de la charge virale VIH-1<sup>14</sup>. Elle est corrélée au nombre de mutations intra épitopiques responsables de l'échappement virologique<sup>15,16</sup>. Certains allèles HLA de classe I sont associés à un meilleur contrôle virologique de l'infection<sup>17</sup>. Enfin, la déplétion chez le macaque infecté par le SIV induit une forte réplication virale<sup>3</sup>.

Les déterminants importants dans la variabilité de cette réponse CTL sont nombreux et font intervenir :

- La qualité de la réponse CTL
- Leur avidité fonctionnelle
- Les facteurs de régulation
- Les facteurs génétiques.

## 1. QUALITE DE LA REPONSE CTL

Bien qu'il existe une corrélation inverse entre la décroissance de la charge virale et le développement de la réponse CTL en phase aiguë de l'infection, cette observation ne se confirme pas en phase chronique de la maladie<sup>18</sup>. Cela s'explique en partie par le fait que la réponse CTL est à la fois une cause et une conséquence du stimulus antigénique : plus la réponse CTL est efficace en réponse au stimulus antigénique et plus celui-ci sera faible et vice versa<sup>19</sup> ce qui fait de la quantification de la réponse CTL un marqueur imprécis de l'efficacité de la réponse immunitaire. Par contre, la qualité de la réponse CTL semble jouer un rôle déterminant. Betts et al. ont montré que chez les patients élités contrôleurs, c'est à dire capables de maintenir une charge virale VIH-1 indétectable en l'absence de traitement antirétroviral, le nombre de réponses CTL capables d'induire la synthèse de plusieurs cytokines est significativement plus élevé<sup>6</sup>. Ces CTL sont qualifiés de polyfonctionnels du fait de leur capacité à sécréter différentes cytokines telles que par exemple l'IFN $\gamma$ , le Tumor Necrosis Factor (TNF)  $\alpha$ , l'interleukine (IL) 2 ou le Macrophage Inflammatory Protein (MIP) 1 $\beta$ . Ces données ont été confirmées à l'égard des réponses CTL dirigées contre l'épitope KRWIILGLNK (KK10, Gag 263-272), restreint par l'allèle HLA-B27 et classiquement associé à un contrôle efficace de la réplication virale<sup>20</sup>. Dans ce modèle, il a été mis en évidence une prédominance des réponses CTL polyfonctionnelles dirigées contre cet épitope comparativement à celles observées envers des épitopes sous-dominants. Des études réalisées sur la muqueuse rectale ont conduit à des conclusions similaires soulignant l'importance de la polyfonctionnalité des réponses CTL dans le contrôle de l'infection<sup>19,21,22</sup>.

## 2. AVIDITE FONCTIONNELLE DE LA REPONSE CTL

Une des façons d'objectiver la qualité de cette réponse CTL vis à vis d'un antigène a été de définir, au delà de l'évaluation de la co-excrétion de multiples cytokines, un critère portant sur leur avidité fonctionnelle. Celle-ci se définit par la concentration antigénique requise pour induire 50 % de la réponse effectrice maximale. Plus l'avidité fonctionnelle du clone CTL est forte et moins la quantité d'antigène nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire efficace est importante.

Au cours de l'infection par le VIH-1, il a été montré que les clones CTL de forte avidité ont une capacité lytique supérieure<sup>23</sup>. Ils sont essentiellement retrouvés parmi les clones spécifiques des épitopes restreints aux HLA-B classiquement impliqués dans le contrôle de l'infection<sup>20</sup>. Cela se traduit par une corrélation inverse entre l'avidité fonctionnelle et la charge provirale, attestant de l'importance de ce paramètre dans l'évaluation de l'efficacité de la réponse CTL<sup>20</sup>. Néanmoins, d'après Chen et al., bien que cette valeur puisse être extrêmement variable selon les clones CTL, elle ne corrèle pas avec la capacité des CTL à inhiber la réplication virale, du fait probablement d'une valeur seuil nécessaire et suffisante à la réponse CTL<sup>24</sup>. Dans certaines situations, l'avidité fonctionnelle pourrait cependant avoir un rôle immunologique discriminatif. Vingert et al. ont montré que chez les patients contrôleurs, il existe un pool de lymphocytes T CD4 mémoires à forte avidité fonctionnelle, capables de reconnaître certains épitopes de Gag bien que présents en quantité faible du fait d'une faible réplication virale<sup>25</sup>. Cette donnée pourrait expliquer l'existence d'une réponse anti-virale forte chez les patients contrôleurs alors que leur charge virale est basse ou indosable.

Les paramètres capables d'influer sur cette avidité reposent sur la quantité d'antigène, l'interaction de celui-ci avec le TCR, la qualité de la synapse et le statut d'activation lymphocytaire T. Bien que les modèles in vitro s'intéressant à l'interaction TCR-complexe peptide/CMH soient imparfaits, il a été montré que cette interaction est de faible affinité et qu'un même TCR n'est pas spécifique d'un seul peptide et qu'il peut donc induire une réaction croisée<sup>26,27</sup>. Le degré de glycosylation du domaine constant du TCR entre également en ligne de compte, probablement par le biais d'une modification de sa flexibilité, altérant ainsi l'interaction avec le complexe peptidique<sup>28</sup>. Parallèlement au type d'interaction, la durée de la synapse et son micro-environnement influent sur le type de réponse CTL. Wiedemann et al. ont montré qu'une synapse prolongée est à l'origine d'une sécrétion cytokinique alors qu'une interaction courte suffit à la lyse cellulaire<sup>29</sup>. Enfin, cette interaction peut paradoxalement être antagoniste et inhiber la réponse immunitaire CTL.

Dans un modèle VIH-1 récent basé sur des tests d'inhibition de la réplication virale, il a été montré une variabilité forte de la réponse CTL selon le type d'épitope viral en accord avec le degré de spécificité peptidique pour le TCR<sup>24</sup>.

### 3. LES FACTEURS DE REGULATION DE LA REPONSE CTL

#### 3.1. CTLA-4 et PD-1

Les molécules de la famille B7-CD28, comprenant PD-1 (programmed death-1), CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte Antigen-4) et leurs ligands jouent un rôle important dans les mécanismes de tolérance et d'auto-immunité. PD-1 et CTLA-4 appartiennent à la famille du CD28. Ils partagent des ligands différents spécifiques :

B7-H1 (PD-L1) et B7-DC (PD-L2) pour PD-1, B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) pour CTLA-4 et CD28.

La reconnaissance simultanée du complexe peptide-HLA avec le TCR (signal 1) et le CD80 ou CD86 par le CD28 (signal 2) induit l'activation lymphocytaire T avec signal de prolifération, de différenciation et de sécrétion cytokinique. La régulation de cette réponse passe notamment par PD-1 et CTLA-4, exprimés de façon inductible par les lymphocytes T après le signal TCR, à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire et de la fin de l'activation lymphocytaire. Le rôle physiologique de ces voies de co-stimulation a pu être attesté dans le modèle murin avec des souris Knock Out pour ces gènes et chez l'homme avec l'utilisation d'inhibiteurs du CTLA-4 (pour une revue cf Chen et al.<sup>30</sup>).

Au cours de l'infection par le VIH-1, la voie PD-1 a été largement impliquée dans l'épuisement de la réponse lymphocytaire T malgré une réplication virale persistante. L'expression de PD-1 a ainsi pu être corrélée au degré de dysfonction CTL évaluée par la capacité de prolifération<sup>31</sup>. Cette dysfonction est réversible et a une implication clinique puisque, chez les patients infectés par le VIH-1 et naïfs de traitement antirétroviral, elle corrèle avec la charge virale et la progression de la maladie<sup>32</sup>.

Les études faites sur le CTLA-4 dans le modèle VIH-1 ont montré que celui-ci est sélectivement surexprimé par les lymphocytes T CD4 spécifiques de la réponse virale, qu'il corrèle de façon inverse à la capacité des T CD4 à sécréter de l'IL2 et que son expression est associée au degré de progression de la maladie<sup>33</sup>.

Ces résultats obtenus sur PD-1 et CTLA-4 sont des arguments forts pour une immunothérapie ciblée sur la voie B7-CD28 chez les patients infectés par le VIH-1. Les essais réalisés *in vitro* ont confirmé que le blocage de PD-1 induit une augmentation de la sécrétion cytokinique par les CTL et une stimulation de la

réponse lymphocytaire TCD4<sup>31,32</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus sur les LTCD4 par le biais du blocage du CTLA-4<sup>33</sup>. Ces résultats restent néanmoins très préliminaires mais pourraient constituer les bases d'une immunothérapie ciblée sur la réponse lymphocytaire T en association à un traitement antirétroviral.

### 3.2. Les Lymphocytes T régulateurs

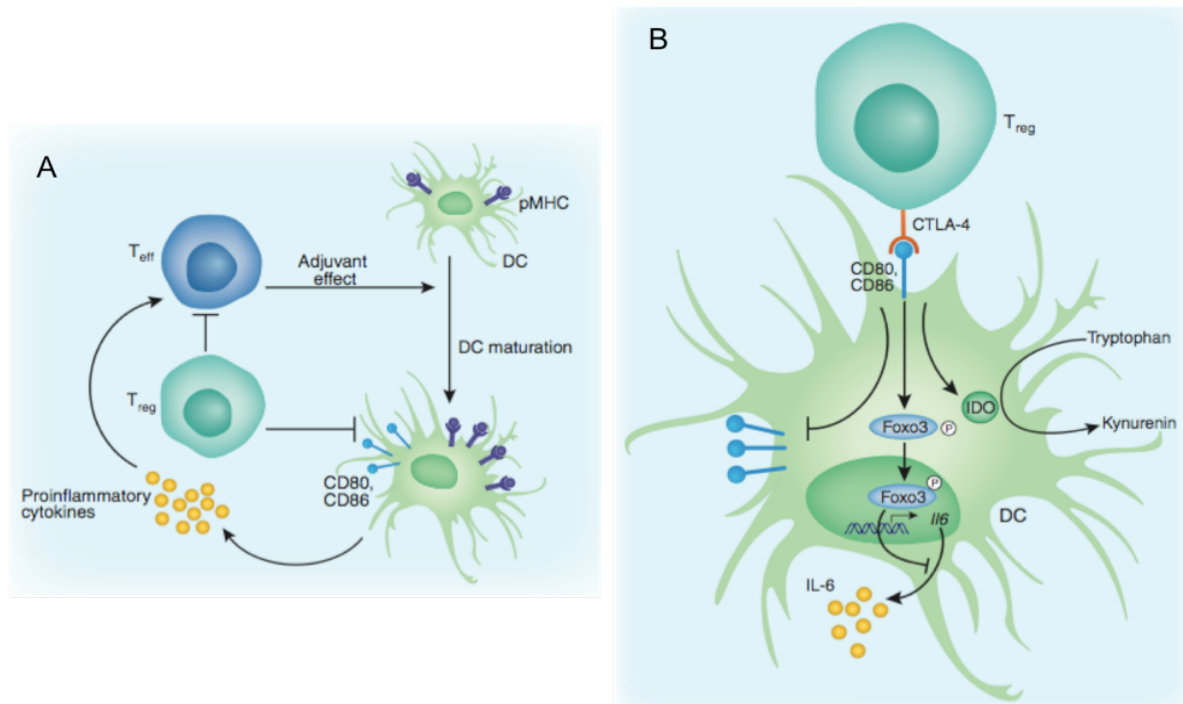
Les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) constituent une population de cellules suppressives naturelles essentielles au maintien de la tolérance et à l'inhibition de l'inflammation. Le facteur de transcription foxp3 est étroitement impliqué dans leur fonction suppressive sur les lymphocytes T, conjointement à d'autres facteurs de co-stimulation tels que le CTLA-4, le CD27, l'OX40 et le GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor).

Ces cellules se caractérisent par une capacité de prolifération faible à une stimulation antigénique, à l'origine de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor  $\beta$ ). Cette sécrétion est potentialisée en présence d'IL-2.

Les Tregs agissent en limitant la capacité proliférative des lymphocytes T effecteurs et en diminuant l'activité de présentation des cellules dendritiques, potentialisant ainsi l'effet inhibiteur sur les T effecteurs (**Figure 1A**). Cette action passe notamment par la voie du CTLA-4 qui active :

- le facteur de transcription régulateur Foxo3, inhibant la synthèse de cytokines
- la voie indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) à l'origine de la production du facteur immunosuppresseur kynurenine (**Figure 1B**)<sup>34</sup>.

**Figure 1 : Mécanismes d'action des Tregs d'après Wing et al.<sup>34</sup>**



Le déséquilibre entre la réponse T régulatrice et la réponse T effectrice à l'égard des auto-antigènes est clairement impliqué dans la physiopathologie des maladies auto-immunes<sup>34</sup>. Dans les pathologies infectieuses et plus spécifiquement dans l'infection par le VIH-1, les résultats sont plus discordants.

L'implication des Tregs dans la persistance de l'infection est fréquemment suggérée. Néanmoins, les études visant à quantifier l'expansion des Tregs dans ce contexte n'ont pas donné de résultats homogènes et reproductibles. Cette difficulté d'analyse vient des marqueurs utilisés pour l'identification des Tregs (CD25, Foxp3, ...), du type de prélèvement (compartiment tissulaire ou sanguin) et du stade de l'infection VIH<sup>35</sup>.

Par opposition au compartiment sanguin, l'évaluation quantitative des Tregs dans les tissus a démontré une expansion significative des Tregs dans les amygdales et le tube digestif des patients infectés. Cette expansion régresse après la mise sous

traitement anti-retroviral<sup>36,37</sup>. Sur le plan fonctionnel, il a été montré que l'activité suppressive des Tregs diminue dans le sang avec la progression de la maladie et pourrait expliquer en partie l'activation immune aberrante observée au cours de l'infection<sup>38</sup>. L'activité suppressive apparaît cependant maintenue et intense dans les tissus, y compris dans les stades avancés de la maladie ce qui pourrait impacter de façon significative sur la réponse lymphocytaire TCD8 nécessaire au contrôle de la réplication virale<sup>39</sup>.

#### 4. LES FACTEURS GENETIQUES

Les études portant sur la génétique des populations au cours de l'infection par le VIH-1 soulignent le rôle protecteur déterminant de certains gènes situés dans la région du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)<sup>4</sup>. La région du CMH est localisée sur le bras court du chromosome 6 et joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Parmi les molécules du CMH de classe I interférant avec les lymphocytes T CD8, on en distingue 3 types : HLA-A, HLA-B et HLA-C. La molécule HLA-B est la plus polymorphique avec plus de 800 molécules différentes décrites versus 486 pour HLA-A et 263 pour HLA-B (IMGT/HLA database : <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Il en résulte une variabilité génétique extrêmement forte à l'échelle mondiale.

Chacune de ces molécules présente une spécificité antigénique propre à la niche peptidique et une modification même discrète de la séquence en acides aminés peut avoir une conséquence majeure sur l'interaction peptide-HLA et donc la réponse immunitaire (à la différence de ce qui est observé avec le TCR).

Au cours de l'infection par le VIH-1, des associations ont été décrites entre certains allèles HLA de classe I et le degré de progression de la maladie. Les allèles impliqués sont tous HLA-B. Les allèles HLA-B\*2705, B\*5101, B\*5701, B\*5702, B\*5703, B\*5801 sont communément associés à une progression lente de la maladie. Par opposition, les allèles HLA-B\*3502, B\*3503 et B\*5802 sont impliqués dans une évolution rapide (pour une revue cf Goulder et al.<sup>40</sup>).

Les premières études qui ont suggéré l'importance de certaines molécules HLA de classe I dans la réponse CTL et l'évolution de la maladie ont porté sur le HLA-B\*27. Il a en effet été montré que certains patients infectés porteurs du HLA-B\*27, mettent en place une réponse CTL intense dirigée contre l'épitope immunodominant KRWILGLNK (KK10, Gag 263-272), capable de maîtriser la réplication virale<sup>41</sup>. Une mutation au sein de cet épitope induit une perte de ce contrôle virologique<sup>42</sup>. Chez les patients porteurs du HLA-B\*57, la réponse CTL observée est dirigée, en phase aiguë, contre l'épitope TSTLQEQIAW (TW10, Gag 240-249). Au cours de l'évolution de la maladie, il est classique d'observer, sous la pression du système immunitaire, l'apparition d'une mutation T242N sans qu'il y ait cette fois-ci de retentissement sur la charge virale. Celle-ci est réversible si elle est transmise à un hôte HLA-B\*57 négatif<sup>43</sup>. Elle se manifeste par une diminution de la capacité répliquative du virus ce qui explique l'absence d'impact négatif de cette mutation sur le contrôle de la maladie<sup>44</sup>.

Les raisons pour lesquelles les molécules HLA-B sont majoritairement associées à un contrôle de la réplication virale sont multiples.

Les études qui se sont intéressées à la capacité de liaison peptidique des molécules HLA de classe I ont montré que les molécules HLA-B ont la particularité d'avoir une diversité forte leur permettant de se fixer à un nombre supérieur de peptides

comparativement aux molécules HLA-A ou HLA-C<sup>45</sup>. Par ailleurs, leur spécificité repose sur leur interaction possible avec les récepteurs KIR des cellules NK potentialisant ainsi la réponse immunitaire. Les molécules HLA-B contiennent en effet le motif Bw4, ligand de certains récepteurs KIR (KIR3DL1+ et KIR3DS1+). Cette liaison induirait l'activation des cellules NK qui sont aussi impliquées dans le contrôle de la réplication virale au cours du VIH<sup>46</sup>.

Parallèlement à cette stimulation de la réponse NK, Harari et al. ont montré que les réponses CTL restreintes par les molécules HLA-B sont plutôt polyfonctionnelles comparativement à celles observées avec les molécules HLA-A ou HLA-C, de façon indépendante à l'épitope présenté<sup>47</sup>. Enfin, plus récemment, Brockman et al. ont confirmé in vitro la baisse significative de la capacité répliquative virale chez les patients exprimant des HLA protecteurs. Cette différence s'observe plus spécifiquement avec les HLA B\*57, B\*5801 et B\*13 comparativement aux autres allèles HLA de classe I<sup>48</sup>. Ces données ont été générées à partir de virus recombinants exprimant des séquences virales Gag-Prot provenant de virus de patients infectés en phase aiguë ou chronique. Il a en effet été montré qu'au delà des molécules HLA-B, c'est le complexe HLA-B/épitope issu de Gag qui a la plus forte corrélation avec le degré de progression de la maladie<sup>49</sup>. Cette corrélation est directement liée au nombre de mutations observées dans Gag. Ces mutations sont réversibles en cas de transmission à un individu n'exprimant pas le même HLA-B et induisent une altération de la réplication virale.

L'impact des mutations induites par le système immunitaire n'est pas comparable selon les protéines. Il est d'autant plus marqué qu'il affecte des séquences plutôt conservées. Kiepiela a montré, au sein de séquences de VIH-1 de sous type C, une variabilité importante selon le type de protéine avec une relative bonne conservation

de p24, RT et Prot alors que Nef et Env sont les protéines présentant la plus forte variabilité<sup>45</sup>. Les mutations d'échappement qui affectent des protéines bien conservées telles que Gag ou les mutations de résistance qui portent sur RT ou prot sont en effet celles qui altèrent le plus la capacité répliquative virale. A ce titre, la présence de réponses CTL dirigées contre Gag est un déterminant pronostique important du contrôle de la maladie comparativement à Env ou Nef<sup>45,50</sup>. Enfin, cette supériorité des réponses dirigées contre Gag vient du fait que, au cours du cycle viral, les épitopes dérivés de Gag sont exprimés en grande quantité et très précocement, induisant des réponses CTL avant que les protéines virales Nef, Tat et rev soient synthétisées de novo<sup>51</sup>. Cette notion est fondamentale dans le sens où Nef dérégule l'expression des molécules HLA-A et HLA-B limitant ainsi, lorsque Nef est exprimée, la réponse CTL<sup>52</sup>.

L'ensemble de ces caractéristiques font du complexe HLA-B/épitope de Gag, une structure immunogène puissante. Néanmoins, cette réponse reste insuffisante au contrôle de la maladie. Elle semble parfois même être délétère, en présence de certains HLA dits non protecteurs (HLA\*B3502 ou B\*3503).

## 5. EVALUATION DE LA REPONSE CTL

### 5.1 ELISpot

Ce test évalue la réponse lymphocytaire T CD8 *ex vivo* par la mesure de la sécrétion de cytokines, classiquement l'IFN $\gamma$ <sup>53</sup>. Il constitue la base de l'analyse de la réponse CTL au cours de l'infection par le VIH-1 et des stratégies vaccinales. L'utilisation de peptides chevauchants permet en effet d'analyser facilement et à un

coût accessible l'ensemble des réponses CTL dirigées contre le protéome entier VIH<sup>54</sup>.

Néanmoins, son interprétation reste délicate dans le sens où la stimulation lymphocytaire se fait à partir de peptides synthétiques définis, limités et utilisés à des doses supraphysiologiques. La réponse mesurée est probablement très éloignée de la réalité puisqu'elle ne fait pas intervenir le répertoire antigénique entier, en permanente évolution du fait de la réplication virale active, auquel la cellule est exposée *in vivo*. Par ailleurs, l'ELISpot ne tient pas compte de l'apprêtement antigénique qui aboutit à la présentation de l'épitope et qui peut considérablement modifier la réponse CTL<sup>12,13</sup>. Enfin, il s'agit majoritairement de réponses mesurées en périphérie, reflet probablement très imparfait de ce qui se passe dans les tissus<sup>55</sup>. L'ensemble de ces raisons explique en partie le manque de corrélation entre la réponse quantitative CTL obtenue par ELISpot et le degré de protection vaccinale effective<sup>56</sup> ou de contrôle de l'infection<sup>57</sup>. Ces résultats ont conduit à affiner l'évaluation de la réponse CTL par la mesure de la sécrétion simultanée de plusieurs cytokines. La réponse CTL est de ce fait définie qualitativement par l'expression de son caractère polyfonctionnel mieux corrélé à l'efficacité de sa réponse<sup>6</sup>.

## 5.2 Tests de lyse cellulaire

Les CTL exercent leur effet effecteur par le biais de la lyse cellulaire médiée par le HLA, les granules cytotoxiques (perforine, granzymes, Fas/Fas ligand) et/ou la sécrétion de cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL2...) et de chemokines (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES ...)

Le gold standard de l'évaluation de la lyse cellulaire a longtemps été le test au chrome (<sup>51</sup>Cr). Ce test consiste à marquer par le <sup>51</sup>Cr des cellules cibles en présence

de cellules effectrices selon un ratio défini. La réponse T CD8<sup>+</sup> est évaluée soit par l'infection des cellules cibles de façon à ce que les antigènes soient apprêtés dans la cellule et présentés par les molécules HLA de classe I, soit par l'adjonction de peptides exogènes restreints aux molécules HLA de classe I présentes sur les cellules cibles. La lyse observée est dans ces conditions directement corrélée à la quantité de <sup>51</sup>Cr libérée par les cellules lysées<sup>58</sup>. Ce test a pour inconvénients la manipulation de produits radioactifs, sa faible reproductibilité et l'absence de renseignement phénotypique sur les cellules effectrices. Par ailleurs, comparativement à l'ELISpot, il semble sous estimer le nombre de CTL. Il a néanmoins le mérite de pouvoir apprécier l'impact de l'apprêtement antigénique dans la réponse CTL.

Une façon détournée d'évaluer l'activité lytique des CTL consiste à quantifier l'expression des protéines cytotoxiques par marquage fluorescent. La mesure de la quantité de CD107a présent à la surface des CTL a cet objectif. Le CD107a correspond à la protéine lysosomale LAMP-1. Il est présent dans la membrane des granules cytotoxiques et est temporairement exposé et détectable à la surface du CTL après la lyse<sup>59</sup>. Cette mesure peut se faire dans le cadre d'un test fonctionnel mettant en jeu des cellules effectrices et des cellules cibles infectées. Migueles et al. ont ainsi montré que la quantité de granzyme B libérée par les CTL mis en présence pendant 3 à 6 jours de lymphocytes T CD4 autologues infectés in vitro était significativement plus forte chez les patients contrôleurs comparativement aux patients progressseurs<sup>60</sup>.

### 5.3 Utilisation des tétramères

Les tétramères permettent de détecter et de quantifier facilement les CTL

spécifiques d'antigène. Cette technique consiste à marquer directement le TCR avec un complexe de quatre unités de CMH de classe-I préalablement chargées de l'épitope d'intérêt. La fixation de ce tétramère couplé à un fluorochrome se fait sans pré-manipulation in vitro des cellules à tester, et est évaluée par cytométrie en flux. La combinaison de ce marquage avec des marquages cytokiniques et de différenciation permet de préciser le phénotype intra- et extracellulaire des cellules T CD8<sup>+</sup> ayant fixé le tétramère. Sa sensibilité est puissante puisqu'une cellule positive sur 5 000 cellules T CD8 totales peut être détectée. Ils sont actuellement largement utilisés dans l'évaluation de la réponse immunitaire au cours des infections mais également des pathologies tumorales<sup>61,62</sup>.

#### 5.4 Tests d'inhibition de la réplication virale

Ce test définit l'habileté des CTL à inhiber la réplication du VIH<sup>63</sup>. Il met en présence des lymphocytes T CD4 autologues qui sont activés puis infectés au troisième jour par le VIH et des lymphocytes T CD8. L'inhibition de la réplication virale est évaluée par l'évolution du taux d'antigène p24 mesuré en ELISA sur sept jours. Ce test paraît plus discriminatif que l'évaluation des réponses CTL par ELISpot. Il a notamment permis de montrer que les CTL spécifiques de Gag ont une capacité d'inhibition de la réplication virale plus marquée comparativement aux CTL spécifiques de Env. Cette différence est d'autant plus forte qu'il s'agit de cellules HLA-B\*27 ou B\*57 apportant une explication supplémentaire au caractère protecteur de ces HLA de classe I<sup>24</sup>.

## CONCLUSION

La réponse CTL au cours de l'infection par le VIH-1 est clairement conditionnée par la présence de molécules HLA de classe I protectrices. Néanmoins le typage HLA seul ne parvient à expliquer la variabilité des réponses observées. L'acquisition de nouvelles techniques a permis de progresser sur l'aspect qualitatif de la réponse CTL notamment par l'évaluation de la polyfonctionnalité, de l'avidité fonctionnelle, de la capacité d'inhibition de la réplication virale et des facteurs de co-stimulation.

Une approche précise de l'efficacité de la réponse CTL est indispensable dans le cadre des stratégies vaccinales afin d'évaluer au mieux l'effet vaccinal potentiel. Cette approche doit être étendue à l'analyse tissulaire de la réponse CTL, le compartiment sanguin n'étant qu'un reflet très imparfait de la réponse immunitaire observée dans les réservoirs.

## 2<sup>ème</sup> PARTIE

### CARACTERISATION MOLECULAIRE DU VIH-1 CRF01\_AE AU VIETNAM ET ANALYSE DE L'IMPACT DES MUTATIONS DE POLYMORPHISME SUR LEUR AFFINITE POUR LES MOLECULES HLA DE CLASSE I

#### INTRODUCTION

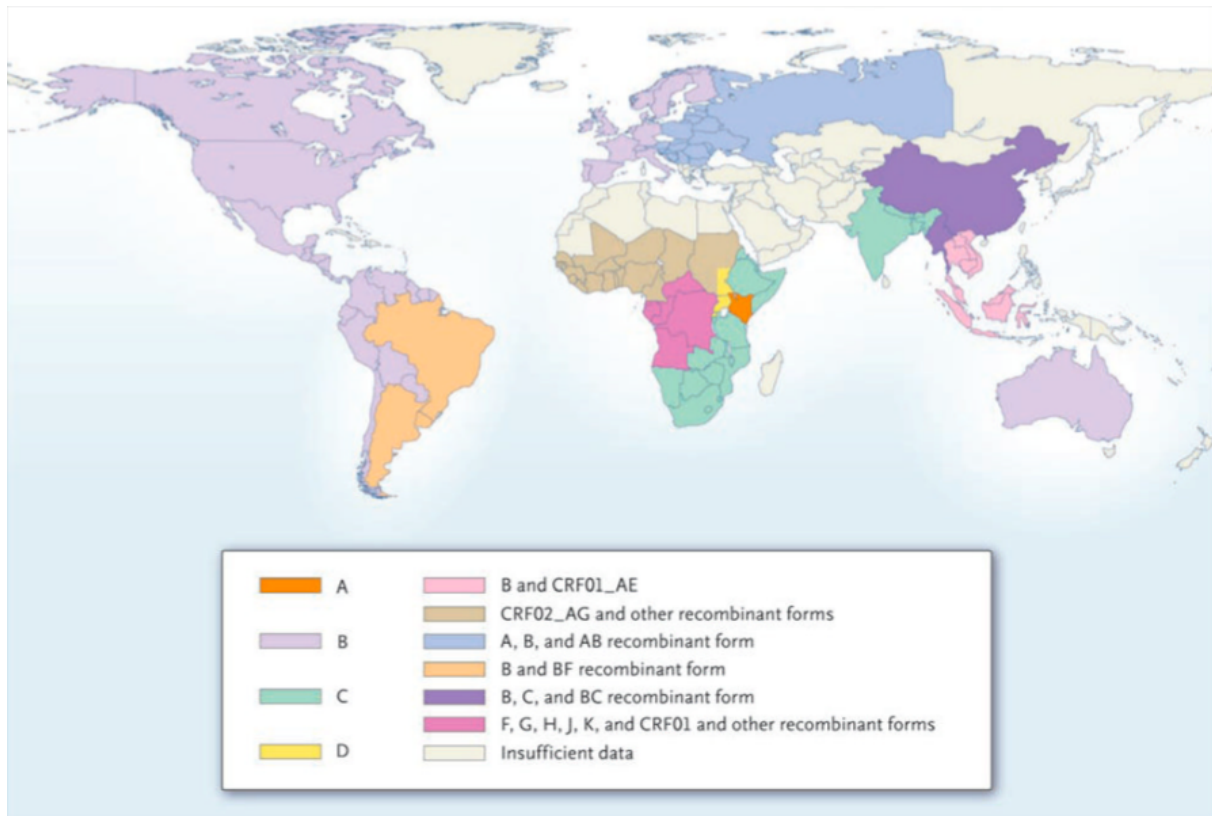
Les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) appartiennent à la famille des Retroviridae et au genre Lentivirus. On distingue le VIH-1 répandu sur l'ensemble des continents et responsable de la pandémie mondiale et le VIH-2 retrouvé en Afrique de l'Ouest. Ces deux virus sont le résultat de plusieurs transmissions inter-espèces de virus simiens (SIV) à l'homme. Le SIV<sub>cpzPtt</sub> (chimpanzés Pantroglodytes troglodytes) est à l'origine du VIH-1 des groupes M et N<sup>64</sup>. L'ancêtre du VIH-1 du groupe O est présent chez le gorille de l'ouest mais le réservoir original serait le chimpanzé<sup>65</sup>. Le VIH-2 est le résultat de la transmission interespèce du SIV<sub>smm</sub> du sootey mangabey<sup>66</sup>.

La transmission singe-homme s'est probablement produite au contact du sang des singes pendant la chasse<sup>67</sup> puis les mouvements de population ont favorisé la propagation de l'infection le long de la rivière du Congo vers le Zaïre où le premier cas d'infection par le VIH-1 a pu être documenté sur un échantillon sanguin en 1959<sup>68</sup>.

Tous ces virus présentent une très forte variabilité génétique, résultat d'un long processus de mutation secondaire à une réplication virale rapide, à un fort taux d'erreur de transcription de la transcriptase inverse et à un taux de recombinaisons important.

Les virus VIH-1 sont classés selon 4 groupes : le groupe majoritaire (M), le groupe Outlier (O), le groupe P récemment décrit<sup>69</sup> et le groupe N (non-M, non-O et non P). Le groupe M comprend actuellement 11 sous-types (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) et 48 formes recombinantes (circulant recombinant forms [CRF]) (<http://hiv-web.lanl.gov>). La variabilité au sein des sous-types est de 15 à 20 % mais elle s'élève à environ 30 % entre les sous-types. Cette évolution dynamique implique une épidémiologie du VIH-1 complexe reflet de l'ancienneté de l'épidémie, des migrations de populations, des facteurs de risque de transmission et de la génétique de l'hôte. Au niveau mondial, les VIH-1 non B représentent 90 % des sous-types circulants. Les sous-types prédominants sont le sous-type C, responsable de 50 % des infections, principalement en Afrique du Sud et en Asie, le sous-type A et le sous-type D en Afrique de l'Est, le CRF02\_AG en Afrique de l'Ouest et le sous-type B en Amérique, en Europe et en Australie. L'ensemble des sous-types et la majorité des formes recombinantes circulent en Afrique centrale (**Figure 2**). Cette diversité a des implications non négligeables sur la progression de la maladie, la réponse au traitement et les stratégies vaccinales.

**Figure 2 : Répartition géographique du VIH-1 dans le monde<sup>70</sup>**



## 1. EPIDEMIOLOGIE DU VIH-1 EN ASIE

### 1.1 Généralités

Les dernières données du rapport OMS 2009 dénombrent en Asie un nombre de 4.7 millions de personnes infectées dont 350 000 nouveaux cas, ce qui place l'Asie en deuxième ligne après l'Afrique Sub-Saharienne en terme de prévalence de l'infection. L'Inde, l'Indonésie et la Chine sont les pays Asiatiques les plus touchés par l'épidémie<sup>2</sup>.

La transmission de l'infection s'est principalement faite au départ au travers de la toxicomanie et de la prostitution avec une dissémination extrêmement rapide de

l'infection. Depuis quelques années, l'infection touche de plus en plus les populations hétérosexuelles avec un taux de contamination élevé parmi les femmes dont les partenaires ont des conduites addictives ou sexuelles à risque. Enfin, le boom économique important de l'Asie cette dernière décennie a induit des mouvements intenses de population facilitant la propagation de l'infection.

La répartition épidémiologique du VIH-1 en Asie est hétérogène. Le sous-type C, qui a initialement dominé l'épidémie en Inde, s'est progressivement étendu au Nord de l'Inde et aux pays voisins tels que le Nepal, le Bangladesh et Myanmar. Le Myanmar est considéré comme un « hot spot » en Asie. Il est le pays où le VIH-1 a une des prévalences les plus fortes, plus particulièrement dans la ville de Mandalay du fait d'une toxicomanie intense. L'épidémie qui s'y est développée a participé à la dissémination des sous types B, C, et de nombreux recombinauts (B/C, CRF07\_BC, CRF08\_BC en particulier) à partir des circuits de trafic de drogue vers le Nord, la Thaïlande et les provinces chinoises du Yunnan et de Xingjiang<sup>71</sup>. Le CRF01\_AE, décrit initialement en Thaïlande dans les années 1980, s'est rapidement propagé aux pays voisins, notamment le Cambodge, le Vietnam, la Malaisie, l'Indonésie, les Philippines et le Singapour. Il représente aujourd'hui 84% des souches circulantes en Asie du Sud Est versus 61% en Asie de l'Est. Cette distribution géographique est en permanente évolution du fait de l'apparition constante de nouveaux recombinauts qui font de l'Asie le continent le plus riche en recombinauts avec une proportion totale de 89 % (pour une revue cf Lau et al.<sup>72</sup>).

## 1.2 Cas du Vietnam

Au Vietnam, les premiers cas de VIH-1 ont été diagnostiqués à Ho Chi Minh Ville en 1990. La propagation de l'infection a été fulgurante depuis avec 293 000

patients infectés en 2007 dont 40 000 nouveaux cas chaque année<sup>73</sup>. Les modes de contamination majoritaires restent, comme dans le reste de l'Asie, la toxicomanie et la prostitution, mais c'est la toxicomanie qui a été responsable du développement et de l'explosion de l'épidémie à partir de 1993 depuis Ho Chi Minh Ville et la province de Khanh Hoa vers le Nord du Vietnam<sup>74</sup>. Contrairement aux autres pays d'Asie, il existe une variabilité génétique faible au Vietnam puisque le CRF01\_AE est le seul type de virus circulant en dehors de quelques cas exceptionnels rapportés de sous-type B, C ou recombinants<sup>9,10,75,76</sup>.

Cette prédominance du CRF01\_AE en Asie du Sud Est (Vietnam, Thaïlande, Cambodge, Laos) alors que d'autres sous-types et recombinants circulent dans des pays frontaliers (Sud-Ouest de la Chine, Myanmar) reste surprenante et suggère le rôle majeur du polymorphisme HLA de l'hôte sur cette répartition géographique. Il est en effet frappant de constater que la distribution mondiale des types de VIH-1 suit un découpage géographique et/ou ethnique proche de celui du typage HLA à l'échelle des populations.

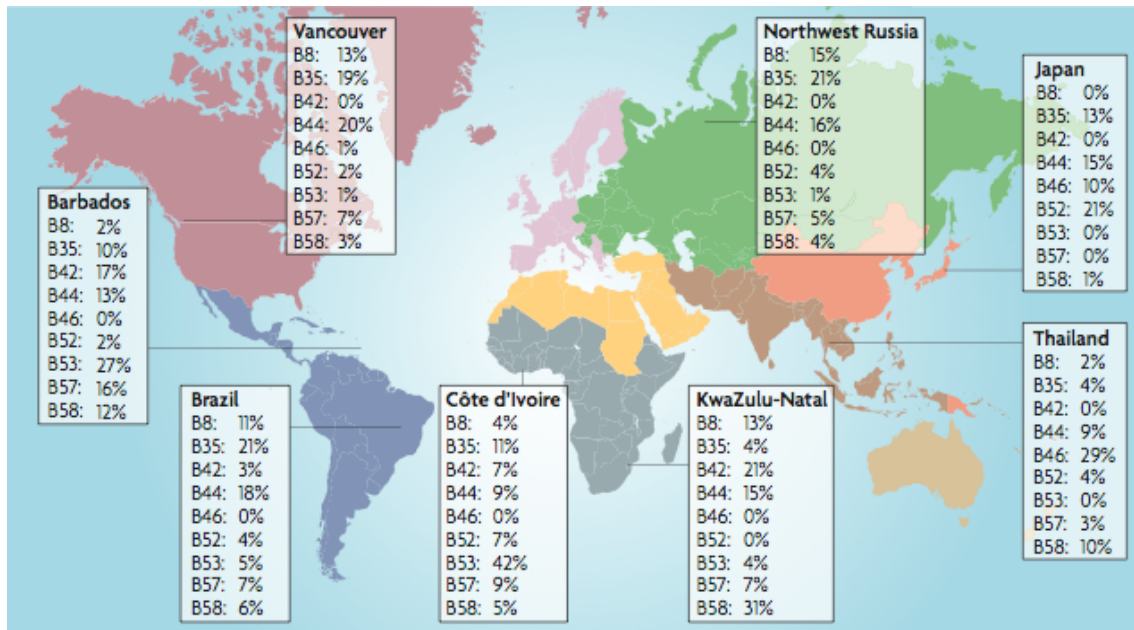
## 2. IMPACT DU POLYMORPHISME DU HLA DE CLASSE I SUR LA VARIABILITE DU VIH-1

Les molécules HLA de classe I et II sont extrêmement polymorphes et responsables de ce fait d'une vaste diversité génétique entre les ethnies. Par ailleurs, le déséquilibre de liaison rajoute de la diversité en générant des combinaisons stables de HLA I et/ou II (haplotypes) dont la composition et la fréquence varient de façon très significative selon les ethnies.

L'étude de la génétique des populations a permis d'effectuer une cartographie

précise du typage HLA des différentes populations, mettant ainsi en exergue les variations alléliques présentes au sein et entre les ethnies (<http://www.allelefreqencies.net>) (**Figure 3**).

**Figure 3 : Exemple de variation Allélique :**  
**distribution de 9 allèles HLA-B dans 8 ethnies** <sup>40</sup>



Au cours de l'infection par le VIH-1, il a été montré que l'homozygotie est associée à une progression plus rapide de la maladie ce qui suggère que le fait d'être hétérozygote assure une présentation d'un plus grand nombre d'épitopes, une plus forte pression immunitaire et donc un meilleur contrôle de l'infection<sup>17,77</sup>. L'existence d'allèles HLA de classe I associés à un bon ou à un mauvais pronostic a été validée dans différentes ethnies (Caucasiens, Afro-Américains, Africains) avec des virus de type B ou C<sup>40</sup>. Il est clairement établi également que les HLA protecteurs induisent des mutations d'échappement dans Gag à l'origine d'une diminution de la réplication virale et réversibles après transmission<sup>44</sup>. Matthews et al. ont confirmé que cette caractéristique ne concerne que les mutations réversibles, les mutations non

réversibles n'ayant pas d'impact sur la capacité répliquative du virus<sup>49</sup>. Néanmoins, les mutations non réversibles échappant à la réponse CTL sont susceptibles de s'accumuler et de créer de nouveaux variants viraux.

Kawashima et al., au travers d'une étude exhaustive réalisée sur plus de 2800 patients des 5 continents, ont montré une forte corrélation entre les mutations d'échappement et la fréquence des HLA impliqués dans cet échappement. Ces travaux confirment de façon manifeste que le VIH-1 subit une adaptation dynamique au HLA de classe I à l'échelle des populations<sup>78</sup>. Cette adaptation signifie que dans le cadre des stratégies préventives, le vaccin devra être perpétuellement réévalué pour une adéquation parfaite. Par ailleurs, l'impact des HLA protecteurs risque de devenir moindre particulièrement dans des populations où ces HLA sont fortement prévalents.

L'impact réel de cette adaptation du virus au HLA en terme de distribution géographique reste à définir. De nombreux travaux ont montré que le polymorphisme HLA n'est pas équivalent au sein des ethnies et qu'en Asie il est bien moindre que celui observé en Afrique<sup>79,80,81</sup>. Cela pourrait expliquer pourquoi il existe une telle diversité génétique du VIH-1 en Afrique alors qu'en Asie, et dans des populations telles que le Vietnam où le typage HLA est relativement homogène, le nombre de virus circulants est plus limité.

### 3. IMPACT DE LA DIVERSITE DU VIH-1 SUR LE PRONOSTIC DE LA MALADIE, LES TRAITEMENTS ET LES STRATEGIES VACCINALES

#### 3.1 Impact de la diversité du VIH-1 sur le pronostic de la maladie

La diversité génétique du virus se répercute sur son mode d'entrée dans les cellules,

sa transmission et le taux de progression de la maladie.

Selon que le virus utilise le co-recepteur d'entrée CCR5 ou CXCR4, on le désigne respectivement par les termes virus R5 ou virus X4, ces derniers apparaissant à un stade avancé de la maladie et étant associés à un pronostic péjoratif. Ciliers et al. ont montré que les sous-types C ont moins de formes X4 que les sous-types B<sup>82</sup> alors que les sous-types D sont plus fréquemment mixtes<sup>83</sup>. Les conséquences cliniques de cette distribution ne sont pas claires.

En terme de transmission virale, plusieurs études plaident vers un risque plus élevé de transmission materno-fœtale lorsqu'il s'agit de virus de sous-type C, en rapport avec une charge virale supérieure dans les sécrétions vaginales comparativement aux sous-types A et D<sup>84,85</sup>. Il a été également suggéré que le CRF01\_AE avait un risque de transmission augmenté par rapport au sous-type B dans une population toxicomane Thaïlandaise<sup>86</sup>.

Les études qui ont visé à établir l'impact des sous-types sur le pronostic de la maladie se sont révélées peu concluantes. Une étude faite au Sénégal chez 54 prostituées infectées par des sous-types A, C, D ou G a montré que le sous-type A était associé à un meilleur pronostic<sup>87</sup>. Ces résultats n'ont pas été confirmés dans une large étude épidémiologique<sup>88</sup>. Néanmoins, il semble exister des arguments forts en défaveur du sous-type D qui serait associé à une progression plus rapide de la maladie, notamment comparativement au sous-type A. Kaleebu et al. ont tiré ces conclusions à partir du suivi d'une cohorte de 1045 Ugandais infectés<sup>89</sup>. Une étude plus récente réalisée au Kenya confirme ces résultats<sup>90</sup>. L'existence d'un double tropisme plus fréquent du sous-type D pourrait partiellement expliquer les résultats.

### 3.2 Impact de la diversité du VIH-1 sur les traitements antirétroviraux

#### 3.2.1 Impact sur la réponse au traitement

De façon paradoxale, les thérapeutiques anti-rétrovirales sont étudiées sur le sous-type B alors que près de 90 % des infections circulantes sont de sous-type non B. Néanmoins, nous disposons depuis quelques années de plusieurs études qui plaident pour une efficacité thérapeutique comparable inter sous-types ou CRFs. La seule exception repose sur le VIH-2 et le VIH-1 groupe O qui possèdent une résistance intrinsèque aux analogues non nucléosidiques de la reverse transcriptase (NNRTI).

Alexander et al. ont montré en 2002, sur une cohorte de 485 patients suivis au Canada un taux de réponse thérapeutique similaire parmi les 21 patients infectés par des sous-types non B<sup>91</sup>. Ces résultats ont par la suite été confirmés sur d'autres cohortes, Françaises<sup>92</sup>, Africaines<sup>93</sup> ou européennes<sup>94</sup>.

#### 3.2.2 Impact sur l'émergence de mutations de résistance

Bien que les analyses globales d'efficacité des drogues anti-rétrovirales n'aient pas révélé de différence stringente, le polymorphisme observé parmi les sous-types ou CRFs impacte clairement sur la survenue de mutations de résistance secondaires comparativement au sous-type B.

Les polymorphismes les plus fréquemment rapportés chez les patients non traités affectent le gène de la protéase : K20R, M36I, H69K/Q<sup>95,96</sup>. Sous traitement antirétroviral, les mutations induisant la résistance sont comparables selon les sous-types et répertoriées de façon exhaustive dans la publication de Bennett et al.<sup>97</sup>.

Certaines d'entre elles semblent néanmoins apparaître de façon plus précoce. C'est

le cas de la K65R, mutation de résistance aux analogues nucléotidiques de la reverse transcriptase (NRTI), qui est présente plus précocement parmi les sous-types C comparativement aux sous-types B<sup>93,98</sup>. Le sous-type C se distingue également par son profil de résistance aux NNRTI, avec 2 profils de mutation : K103N ou V106M alors que la mutation V106M ne s'observe qu'exceptionnellement avec le sous-type B<sup>99,100</sup>. Enfin la résistance au nelfinavir se traduit pour les sous-types non B par l'apparition de la mutation L90M alors qu'avec les sous-types B elle s'observe avec la D30N ou la L90M<sup>101</sup>.

### 3.3 Impact de la diversité du VIH-1 sur les stratégies vaccinales

Bien que des réactions croisées à l'égard d'autres sous-types aient été mises en évidence<sup>102</sup>, la variabilité génétique du VIH-1 et les nombreuses mutations d'échappement impliquent une adaptation constante des stratégies vaccinales.

Le développement de vaccins induisant des anticorps neutralisants dirigés contre l'enveloppe trimérique du virus n'a pas donné de résultats contributifs<sup>103,104</sup>.

Les stratégies vaccinales les plus développées reposent sur les vaccins vivant à stimuler l'immunité cellulaire T à visée vaccinale ou thérapeutique. Elles font appel à des combinaisons d'immunogènes dérivés de régions conservées du VIH-1 à partir de différents sous-types ou CRFs.

L'ANRS a développé un programme vaccinal reposant sur l'utilisation de lipopeptides. Il s'agit de molécules hybrides constituées de larges fragments synthétiques polypeptidiques du VIH-1 associés à des lipides. La partie lipidique assure une meilleure pénétration des peptides dans les cellules présentatrices de l'antigène, favorisant ainsi la réponse immunitaire cellulaire. Ces vaccins ont été

proposés dans des stratégies préventives ou thérapeutiques<sup>105</sup>. Ils ont dans les deux contextes généré des réponses humorales et cellulaires mais l'efficacité de ces réponses doit être validée par des essais randomisés contrôlés<sup>106,107,108</sup>.

Le laboratoire de recherche Merck a développé un vaccin à adénovirus recombinant contenant les gènes Gag, Pol et Nef issus du sous-type B et ayant fait l'objet de l'essai vaccinal STEP. L'essai a dû être arrêté en cours de phase 2B du fait d'une augmentation du risque d'acquisition de l'infection parmi les patients vaccinés possédant une immunité préexistante vis à vis des adénovirus<sup>109</sup>.

Le vaccin du National Institute of Allergy and Infectious diseases a proposé une nouvelle approche vaccinale à partir d'une combinaison de 2 vaccins : un vaccin à ADN boosté par un vaccin à adénovirus recombinant, exprimant communément les gènes Gag et Pol du sous-type B, le gène Env des sous-types A, B et C et le gène Nef du sous-type B. Ce vaccin multi-clade a été testé en Afrique en phase I/II avec une bonne tolérance et immunogénicité (détection d'anticorps chez 80 % des sujets vaccinés et de réponses CTL chez plus de 60 % d'entre eux)<sup>110,111</sup>. Les essais de phase 2B sont en cours afin de tester son efficacité.

L'essai Thai RV144 récemment publié a combiné, dans une stratégie de prime double boost 2 vaccins : une forme recombinante canarypox (ALVAC-HIV) et un recombinant contenant la sous unité gp120 des sous types B et CRF01\_AE (AIDSVAX B/E). Ces deux vaccins avaient déjà été testés indépendamment sans aucune efficacité<sup>112</sup>. Il s'agit du premier essai à avoir mis en évidence une efficacité relative avec un taux de transmission diminué de 31% en intention de traiter. Ce vaccin n'a pas montré de diminution de la charge virale chez les patients vaccinés infectés. Ces résultats sont actuellement explorés par la communauté scientifique afin d'objectiver sur le plan immunologique cette efficacité vaccinale relative.

Les essais évoqués ici ne sont qu'un faible échantillon des stratégies vaccinales proposées dans le domaine. Néanmoins, ils démontrent de façon certaine l'inefficacité de ces stratégies. Un vaccin préventif contre le VIH ne pourra être efficace que s'il parvient à induire à la fois une réponse CTL puissante et croisée combinée à la synthèse d'anticorps neutralisants à large spectre.

#### 4. PRESENTATION DU PROJET VIETNAM

Au Vietnam, l'épidémie du VIH-1 s'est manifestée par une extension rapide et un taux de transmission élevé à l'origine d'une forte prévalence<sup>73, 86</sup>. De façon étonnante, malgré un brassage continu des populations, le CRF01\_AE est largement majoritaire<sup>9,10,75,76</sup>. Par ailleurs, les études portant sur la génétique des populations ont montré que le typage HLA des populations asiatiques est relativement homogène, comparativement aux populations africaines.

Nous avons donc souhaité, à partir de ce projet de recherche :

- Caractériser le polymorphisme des souches de VIH-1 circulant au Vietnam,
- Définir le typage HLA de classe I des patients infectés,
- Identifier des clusters d'épitopes CTL potentiellement présentés par les allèles HLA de classe I exprimés dans la population Vietnamiennne,
- Evaluer l'impact du polymorphisme viral sur la présentation des épitopes CTL par ces mêmes molécules HLA.

#### 4.1 Sequences of Clustered Epitopes in Gag and Nef Potentially Presented by Predominant Class I Human Leukocytes Antigen (HLA) Alleles A and B Expressed by Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1)-Infected Patients in Vietnam<sup>1</sup>. ANNEXE 1

L'existence de régions immunodominantes et conservées inter-sous-types et/ou inter-CRFs a été clairement démontrée à partir de l'analyse des réponses CTL obtenues par ELISpot à partir de peptides chevauchant couvrant l'ensemble du génome B<sup>54</sup>.

Notre projet de recherche s'est intéressé aux régions immunodominantes potentielles présentes dans des souches de VIH-1 circulant au Vietnam. Nous avons ciblé notre recherche sur Gag et Nef du fait de leur immunogénicité et sur les régions pluri-épitopiques telles qu'elles étaient définies dans un premier essai vaccinal lipopeptidique chez des sujets sains<sup>106</sup>.

Gag est en effet considéré comme une des régions les plus immunogènes, du fait de sa faible variabilité, sa présentation très précoce et sa capacité à générer des mutations d'échappement altérant la réplication virale<sup>40</sup>. Le rôle de Nef a été souligné dans des populations Thai exposées au virus mais restant séronégatives, chez lesquelles des réponses CTL fortes étaient identifiées à l'égard d'un peptide de Nef (QVPLRPMTYK, position 73-83) restreint par le HLA-A\*1101<sup>113</sup>.

Notre étude a fait l'objet d'un projet collaboratif avec le Centre de Médecine Préventive de Ho Chi Minh Ville qui a assuré le recrutement de 28 patients naïfs d'antirétroviraux.

Sur ces 28 échantillons, il a été effectué un typage HLA de classe I (A et B) et un séquençage de Gag et de Nef. A partir de ces données, nous nous sommes

focalisés sur les régions pluriépitopiques de Gag et Nef restreintes par des HLA de classe I fréquents dans notre population (exprimés chez au moins 14 % de nos patients). Ces régions sont référencées sur la base de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). L'affinité pour la molécule HLA de classe I des épitopes d'intérêt a été définie à partir des sites de prédiction BIMAS (<http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla-bind/>) et SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>).

Le typage HLA-A et B a mis en évidence la prédominance des allèles HLA-A11, A02, A33 et de la superfamille B15. Les 28 échantillons correspondaient à du CRF01\_AE. Nous avons montré que le degré d'homologie vis à vis de la séquence HxB2 était de 94,4 % pour Gag et 75 % pour Nef. Quatre régions pluri épitopiques contenant des épitopes restreints par des HLA de classe I fréquemment retrouvés au Vietnam ont été identifiées, 1 dans Gag et 3 dans Nef. Pour 2 d'entre elles, les mutations intra-épitopiques observées étaient associées à un meilleur score d'affinité. Pour une des régions pluri-épitopiques, il existait au contraire un score d'affinité plus faible, et donc une réponse CTL possiblement moins efficiente.

Ce travail a permis de définir des régions pluri-épitopiques potentielles au sein de Gag et de Nef dans des virus CRF01\_AE. Ces régions sont importantes dans le cadre de stratégies vaccinales qui doivent tenir compte des divers sous-types dans l'objectif d'induire des réponses immunitaires à large spectre. Néanmoins, bien qu'elles contiennent de nombreux épitopes restreints par des molécules HLA de classe I exprimées par des populations vietnamiennes, les mutations intra-épitopiques peuvent altérer la présentation. Une confrontation de ces données par une évaluation *in vitro* de la réponse CTL est indispensable à la validation de ces résultats.

#### 4.2 Molecular Characterization of HIV-1 CRF01\_AE in Mekong Delta, Vietnam, and Impact of T-cell Epitope Mutations on HLA Recognition (ANRS 12159). ANNEXE 2

Ce travail a pu être étendu dans un deuxième temps par le projet ANRS 12159, consacré à la caractérisation moléculaire du VIH-1 dans le Mekong.

L'objectif de ce projet était d'identifier les sous-types et CRFs circulant dans la partie sud du Vietnam de 5 provinces du Mekong (Dong Nai, Vung Tau, Tien Giang, An Giang et Dong Thap) afin d'apprécier la variabilité intra-épitopique. Le séquençage de RT, Prot et Env a été effectué à Ho Chi Minh Ville alors que Nef et Gag ont été séquencés à Bordeaux conjointement à un typage HLA de classe I de l'ensemble des échantillons.

125 échantillons de patients infectés par le VIH-1 et non traités ont été exploités.

L'originalité de ce projet repose sur la description de souches de VIH-1 circulant dans une région jamais explorée du Vietnam dans l'objectif de :

- Typer les virus VIH-1 circulants,
- Décrire le profil des mutations de polymorphisme et de résistance aux antirétroviraux,
- Décrire le typage HLA de classe I de cette population.

Nous avons montré que nos 125 échantillons correspondent à du CRF01\_AE sur l'ensemble des séquences. Des mutations de résistance ont été détectées chez 7 patients parmi 122 patients qui affirmaient ne prendre ou n'avoir pris aucun traitement soit une prévalence de 5,3 %. Elles portent majoritairement sur la RT avec des résistances prédominantes ciblées sur les analogues non nucléosidiques de la

transcriptase inverse. Les mutations observées sur la protéase sont en rapport avec des polymorphismes naturels du CRF01\_AE, y compris la mutation 46I.

Nous avons exploité les séquençages de Gag, RT et Prot afin de définir une séquence consensus (Séquence Mekong) réunissant les mutations de polymorphisme observées dans plus de 50 % des séquences. Le pourcentage d'homologie de cette séquence consensus comparativement au consensus B est de 93.2%, 92.9% et 85.1 % pour RT, Prot et Gag respectivement.

Le typage HLA de classe I de haute résolution nous a permis de définir le profil allélique de 116 patients. Nous avons identifié 21 allèles HLA-A marqués par la prédominance du A\*1101, A\*2402 et A\*3303 avec des fréquences respectives de 23.7%, 13.8% et 10.3%. Parmi les 42 allèles HLA-B identifiés, les allèles présents chez plus de 7.5 % de la population sont B\*1502, B\*3802, B\*0705 et B\*4601. Le typage HLA-Cw a identifié 21 allèles différents, Cw\*0801, Cw\*0702 et Cw\*0102 étant les plus fréquents (fréquence de 17.6%, 15.7% et 11.1% respectivement). L'étude du déséquilibre de liaison nous a permis de décrire plusieurs haplotypes dont les plus fréquents sont B\*1502-Cw\*0801 (23.3%) et A\*2901-B\*0705-Cw\*1504/1505 (9.5%). Ce typage HLA de classe I souligne dans cette population l'importance de certains allèles caractéristiques de la population asiatique (HLA-A\*1101 et B\*4601). La sur-représentation des allèles HLA-A\*2901, B\*0705 et B\*1512 est typique des populations vietnamiennes. Ce typage apparaît comme relativement homogène avec un panel d'allèles HLA de classe I peu élargi.

Les résultats de cette analyse descriptive nous ont permis de tirer plusieurs conclusions :

- Le CRF01\_AE reste la souche largement prédominante au Vietnam

- 5.3% des souches circulantes en 2008 présentent des mutations de résistance primaires aux antirétroviraux dans cette partie sud du Vietnam correspondant à des provinces du Mekong et donc hors Hanoi et Ho Chi Minh Ville
- Le typage HLA de classe I correspond à une spécificité ethnique Vietnamienne avec un profil homogène mais caractéristique.

Les études de phylogénie VIH réalisées à ce jour au Vietnam ont toutes conclu à une prédominance massive du CRF01\_AE, que ce soit à Ho Chi Minh Ville ou dans le Nord du Vietnam (villes de Hai Phong, Hanoi et provinces avoisinantes)<sup>1,9,10,72,76</sup> Cependant aucune donnée n'était disponible dans les provinces du delta du Mekong. Nos résultats concordent avec ceux rapportés dans les autres régions du Vietnam. Bien qu'ils étaient attendus, la circulation d'une souche unique de VIH-1 reste inexplicée. En effet, l'importance des recombinaux en Asie, l'intensité de l'épidémie au Vietnam et le brassage perpétuel des populations devraient favoriser la circulation de souches différentes, ce qui n'est pas le cas. Nous nous sommes demandés si cette prédominance du CRF01\_AE n'était pas liée à une altération de la réponse CTL, le polymorphisme intra-épitopique pouvant diminuer leur reconnaissance par les molécules HLA de classe I, d'autant plus qu'elles sont relativement homogènes dans la population asiatique.

La deuxième partie du projet a consisté à évaluer l'impact du polymorphisme viral des épitopes CTL (définis sur la base de Los Alamos : <http://www.hiv.lanl.gov/>) sur l'apprêtement antigénique et l'affinité pour la molécule HLA de classe I. Cette analyse a porté sur les épitopes de RT, Gag et Prot à partir de logiciels de prédiction disponibles sur l'immuneepitope database (<http://www.immuneepitope.org/>).

L'apprêtement antigénique a été déterminé par

- le TAP (Transporter associated with antigen processing) score définissant la capacité de l'épitope à se fixer sur TAP au cours de son transport cellulaire,
- le proteasome score définissant l'efficacité du clivage protéique.

Le MHC score définit l'affinité de l'épitope pour la molécule HLA de classe I.

Chacun de ces scores étant exprimé en valeur logarithmique, une valeur élevée est en faveur d'une bonne présentation épitopique.

Nous avons défini la valeur de ces 3 scores pour tous les épitopes CTL contenus dans Gag, RT et Prot tels qu'ils sont décrits dans les séquences de type B de la base de Los Alamos. Nous avons comparé ces valeurs à celles obtenues pour ces mêmes épitopes éventuellement mutés dans les séquences CRF01\_AE des patients porteurs de l'allèle HLA de classe I censé restreindre l'épitope.

Nos résultats montrent que les épitopes présents dans les séquences CRF01\_AE présentent un TAP et un proteasome score comparables. Par contre, le MHC score est significativement diminué (2 versus 2.3,  $p < 0.0001$ ) en rapport avec une moins bonne affinité pour la molécule HLA de classe I.

L'interprétation de ces résultats doit cependant être prudente. Il s'agit de logiciels de prédiction et ils justifient donc une confrontation *in vitro* type ELISpot, ce qui n'a pas été réalisable en l'absence de cellules disponibles. En effet, ces logiciels ne tiennent pas compte de facteurs importants tels que la quantité de protéine dégradée ou d'immunoprotéasome, le type de cellules impliquées dans la dégradation protéique et l'impact de mutations présentes dans les séquences flanquantes des épitopes, aspects qui seront largement abordés dans la deuxième partie de la thèse<sup>12,13</sup>. Enfin, l'absence d'évaluation *in vitro* de la réponse CTL nous a privés de renseignements portant sur l'existence éventuelle de réactions croisées, de nouveaux épitopes ou de mutations de compensation<sup>102</sup>.

Malgré ces limites, cette étude nous a montré que dans un modèle prédictif, les mutations intra epitopiques observées dans les séquences CRF01\_AE sont responsables d'une altération de l'affinité de ces épitopes pour leur molécule HLA de classe I comparativement aux souches B. Ces mutations seraient à la faveur d'un échappement virologique au sein de la population vietnamienne pouvant expliquer la progression rapide de l'infection depuis 1990 dans ce pays et la prédominance de cette souche unique peu accessible à la réponse CTL.

### 3<sup>ème</sup> PARTIE

## IMPACT DE L'APPRETEMENT ANTIGENIQUE SUR LA REPONSE CTL AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH-1

### INTRODUCTION

La présentation des peptides par les molécules du CMH suit les voies de dégradation protéolytique utilisées par les cellules eucaryotes et définissant l'apprêtement antigénique :

- les protéines extracellulaires sont dégradées par l'appareil lysosomal en peptides présentés par les molécules du CMH de classe II,
- les peptides présentés par les molécules du CMH de classe I sont générés à partir de la dégradation des molécules intracellulaires par le système ubiquitine-protéasome et autres peptidases<sup>114,115</sup>.

La reconnaissance d'une cellule infectée dépend de sa capacité à générer à sa surface des épitopes susceptibles d'être présentés par les molécules HLA de classe I afin d'induire une réponse CTL. Cette réponse CTL n'est pas homogène et est en général ciblée sur quelques épitopes. Cette réponse est hiérarchisée selon le degré d'immunodominance des épitopes. Ainsi, au cours de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1, chez les sujets porteurs de l'allèle HLA-B\*5701, les réponses CTL sont largement dominées par l'épitope TSTLQEQIGW (TW10, p24) reconnu avec une fréquence de 86 %<sup>116</sup>.

L'évaluation de ces réponses est classiquement déterminée par des tests ELISpot, mais ces tests ne prennent pas en compte les étapes clés à l'origine de la synthèse des épitopes.

L'importance de l'apprêtement antigénique dans la réponse CTL a été soulignée dans le modèle murin. Les souris déficitaires pour certaines aminopeptidases (ERAAP/ERAP1) ou des sous-unités d'immunoprotéasomes modifient leur réponse CTL en modulant leur profil d'immunodominance<sup>117,118</sup>.

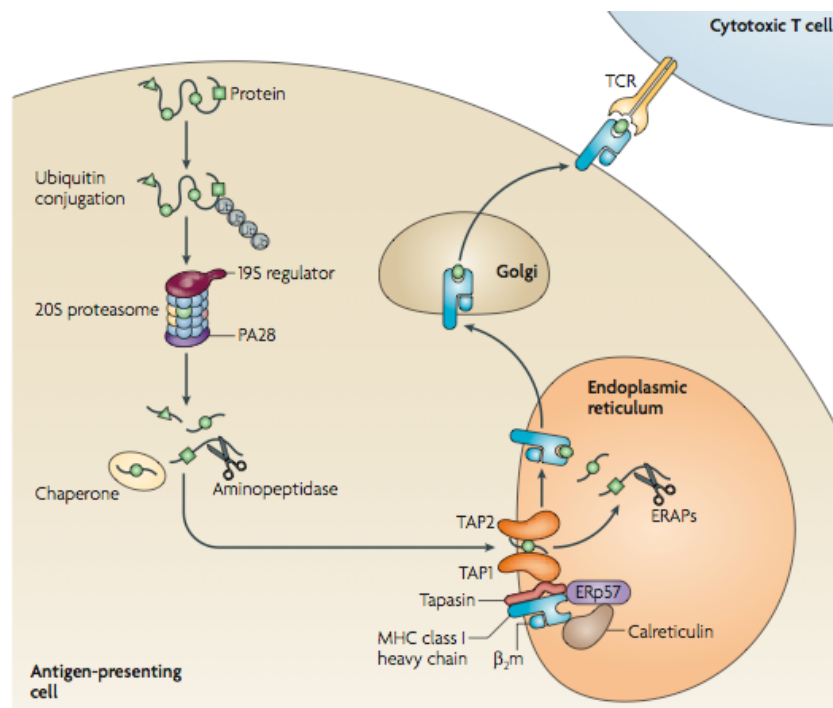
Au cours du VIH-1, Le Gall et al. ont montré que l'immunodominance de certains épitopes est secondaire à un apprêtement antigénique plus efficace et que celui-ci peut-être modifié par des régions flanquantes situées de part et d'autre de l'épitope<sup>12</sup>.

Nous avons souhaité évaluer, dans le modèle de l'infection par le VIH-1, quel était l'impact sur l'apprêtement antigénique de deux autres paramètres : le type cellulaire impliqué dans la présentation et la demi-vie intracellulaire de l'épitope. Ces travaux ont été réalisés à Boston sous la gouverne du Pr Sylvie Le Gall, département d'immuno-virologie du Pr Bruce Walker au Ragon Institute du Massachusetts General Hospital et Harvard Medical School, Boston (USA).

# 1. LES ETAPES DE L'APPRÊTEMENT ANTIGENIQUE DES EPITOPES PRESENTES PAR LES MOLECULES HLA DE CLASSE I

## 1.1 Présentation générale

**Figure 4 : Les étapes de l'apprêtement antigénique. D'après Groettrup et al. <sup>119</sup>**



**Etape 1 :** Ubiquitination des protéines intracellulaires

**Etape 2 :** Dégradation des protéines par le protéasome, qui comprend l'unité catalytique 20S, le corps régulateur 19S et le complexe activateur PA28

**Etape 3 :** Les produits de dégradation de petite taille sont éliminés. Les oligopeptides susceptibles de devenir antigéniques sont ceux qui présentent une extrémité C-terminale définie par le protéasome et une extrémité N terminale plus ou moins longue qui sera secondairement clivée par des aminopeptidases.

**Etape 4 :** Les oligopeptides comportant 9 à 16 acides aminés sont captés par le transporteur TAP dans le réticulum endoplasmique où les aminopeptidases ERAP 1 et 2 leur confèrent la taille idéale à leur liaison aux molécules du CMH

**Etape 5 :** Présentation de l'épitope à la surface de la cellule.

## 1.2 Le système ubiquitine-protéasome<sup>114,120,121</sup>.

### 1.2.1. Ubiquitination des protéines

La voie de l'ubiquitine, décrite il y a plus de 10 ans, a valu le prix Nobel de biochimie en 2004 aux scientifiques Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Ernie Rose<sup>122</sup>.

L'ubiquitine est une petite protéine présente dans toutes les cellules des eucaryotes. C'est son caractère ubiquitaire qui lui a donné son nom. Sa fonction principale est de marquer d'autres protéines en vue de leur protéolyse par le protéasome. Plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées de façon covalente à la protéine cible (polyubiquitination), grâce à l'action de trois enzymes, E1, E2 et E3-ligases. L'enzyme activatrice E1 assure l'activation de l'ubiquitine par carboxylation terminale. La molécule activée d'ubiquitine est conjuguée sur un groupe sulfure par l'enzyme conjugante E2 puis transférée via une ubiquitine-ligase E3 à un groupe amyle d'une lysine acceptrice de la protéine à dégrader. Ce processus peut se répéter de nombreuses fois jusqu'à former un polymère. Il faut au moins quatre molécules d'ubiquitine fixées à la protéine pour que celle-ci soit adressée au protéasome et dégradée.

### 1.2.2. Structure du Proteasome

Le complexe protéasome 26S est une structure enzymatique multiprotéique. Il comprend le complexe 20S qui a une forme de baril et possède une cavité en son centre cernée par quatre anneaux, fournissant ainsi un espace clos pour la digestion des protéines. Chaque anneau est composé de sept protéines: les deux anneaux intérieurs sont constitués de sept sous unités  $\beta$  qui contiennent le site actif de la

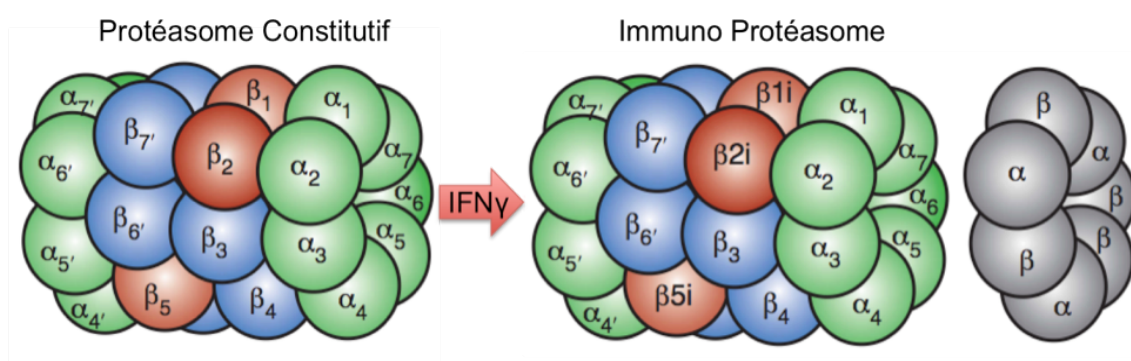
protéase, tandis que les deux anneaux extérieurs contiennent sept sous-unités  $\alpha$  dont le rôle consiste à maintenir l'ouverture par laquelle les protéines à dégrader pénètrent dans le baril: ces sous-unités  $\alpha$  sont capables de reconnaître les marqueurs de polyubiquitine qui régulent le processus de dégradation.

Le complexe régulateur 19S est composé de 6 sous-unités ATPase dépendantes et de 9 à 10 sous-unités non ATPase dépendantes fixées à la portion heptamérique  $\alpha$  du protéasome 20S.

Le site catalytique est précisément désigné par les sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_5$  représentant 3 activités catalytiques différentes : l'activité chymotrypsine-like (clivage après un résidu hydrophobique), l'activité trypsine-like (clivage après un résidu basique) et l'activité caspase-like (clivage après un résidu acide).

L'interféron- $\gamma$  induit la synthèse de l'immunoprotéasome constitué des sous-unités  $\beta_{1i}$  (également appelées LMP2 ou X),  $\beta_{5i}$  (également appelées LMP7 ou Y),  $\beta_{2i}$  (également appelées MECL1 ou Z) et du complexe activateur PA28<sup>123</sup> (**Figure 5**).

**Figure 5 : Représentation schématique du protéasome d'après Kloetzel et al.<sup>123</sup>**



L'activation et l'ouverture du complexe 20S du protéasome constitutif ou de l'immunoprotéasome survient grâce à l'interaction du complexe 20S avec le complexe régulateur 19S ou le PA28

### 1.2.3 Fonctions du Proteasome

Le protéasome a deux fonctions essentielles :

- une fonction catalytique assurant la dégradation des protéines défectueuses, mal repliées, dénaturées ou obsolètes, de façon à prévenir leur accumulation dans la cellule. Cette fonction conditionne la survie cellulaire.
- Une fonction immunologique du fait de sa capacité à synthétiser des oligopeptides destinés à la présentation par le CMH à partir des protéines cytosoliques.

Cette fonction reste très sélective puisqu'il est démontré que plus de 70 % des produits de dégradation du protéasome sont trop courts pour être présentés par les molécules HLA de classe I<sup>124</sup>. Ceux qui sont suffisamment longs peuvent subir des clivages complémentaires et donc être secondairement détruits par des peptidases cytosoliques. Seule une infime fraction de peptides a la taille requise à la liaison aux molécules HLA de classe I. Les autres oligopeptides destinés à la présentation antigénique sont plus longs du fait de la présence d'une extension N terminale. Leur caractéristique commune est l'absence d'extension C-terminale, résultat du clivage par le protéasome. Les expériences de Golberg et al. ont montré que la présentation de l'épitope SIINFEKL, issu de l'ovalbumine, est dépendante du protéasome lorsque l'on rajoute des résidus en position C terminale de l'épitope, ce qui n'est pas le cas avec des résidus en position N terminale<sup>125</sup>. Le protéasome est donc un déterminant essentiel de l'extrémité C-terminale de l'épitope. L'extension N-terminale est secondairement clivée par des aminopeptidases.

### 1.3 Apprêtement antigénique post-protéasome

#### 1.3.1. Transport des oligopeptides vers le réticulum endoplasmique (ER)

Les précurseurs épitopiques à extension N-terminale se caractérisent par une susceptibilité aux peptidases cytosoliques plus faible et donc une plus grande stabilité intracellulaire facilitant leur apprêtement et leur présentation finale<sup>125</sup>. Ils sont transportés dans le ER via le transporteur TAP auxquels ils se lient avec une forte affinité. Ce transport est altéré en présence d'une proline en position 2 ou 3 de l'oligopeptide<sup>126</sup>.

#### 1.3.2. Rôles de ERAP1 et ERAP2 (Endoplasmic Reticulum AminoPeptidase 1 & 2)

Comme toutes les aminopeptidases, ERAP1 a la capacité de cliver tous les acides aminés présents en position N-terminale (excepté ceux suivis par une proline). Son activité est d'autant plus forte que le substrat a une taille de 9 à 16 acides aminés, ce qui est en totale adéquation avec la taille des oligopeptides transportés par TAP<sup>125</sup>. La particularité de ERAP1 est sa capacité à monitorer le clivage de l'oligopeptide de façon à stopper celui-ci dès lors que la taille optimale de 8 à 9 résidus est atteinte. Son rôle a clairement été démontré dans le modèle de dégradation de l'ovalbumine où en l'absence d'ERAP1 la présentation de l'épitope SIINFEKL est diminuée de 70 %<sup>127</sup>.

Dès lors que l'épitope a atteint au sein du ER la taille adéquate et sous réserve qu'il dispose des résidus d'ancrage corrects, il peut se lier à la molécule HLA de classe I afin d'être présenté à la surface de la cellule.

ERAP2 a pour l'instant une activité essentiellement de clivage des résidus N-

terminaux sans limitation. Son rôle dans la présentation antigénique reste à démontrer.

Les activités de ERAP 1 et 2 sont augmentées en présence d'IFN $\gamma$ .

### 1.3.3. Rôle des peptidases cytosoliques

L'existence de peptidases cytosoliques impliquées dans l'apprêtement antigénique a été suggérée par Craiu et al.<sup>128</sup>. Ils ont en effet montré que l'épitope SIINFEKL est efficacement présenté, même en l'absence du proteasome, lorsqu'il est lié à une extension N-terminale de 25 résidus l'empêchant de se fixer à TAP. Cela suggère la présence d'aminopeptidases cytosoliques jouant le rôle d'ERAP. Parmi ces enzymes ont été identifiées la leucine aminopeptidase (LAP), IFN $\gamma$  inducible, la bleomycine hydrolase (BH) qui est une cystéine protéase et la puromycine-sensible aminopeptidase (PSA). BH et PSA ne sont pas sensibles à l'IFN $\gamma$ <sup>115</sup>.

La tripeptidyl peptidase II (TPPII) est une enzyme protéolytique volumineuse (>3.5 MDa) capable de cliver 3 résidus à la fois à partir de l'extension N-terminale. Il semblerait qu'elle agisse conjointement à la PSA sur les peptides longs contenant plus de 15 acides aminés<sup>129,130</sup>. Cette activité tripeptidique s'associe à une activité endoprotéolytique clivant de préférence après les résidus lysines. Dans le modèle du VIH-1, il a été montré que la présentation d'un épitope spécifique de Nef, restreint par le HLA-A3, QVPLRPMTYK (73-82) est conditionnée par la présence de TPPII<sup>131</sup>. Du fait de sa double activité enzymatique, il est possible que TPPII ait deux actions différentes au cours de l'apprêtement antigénique :

- Son activité endoprotéolytique lui permet de cliver des volumineux peptides qui secondairement seront pris en charge par la sous-unité libre 20S du

protéasome,

- Son activité aminopeptidase assure le clivage des oligopeptides présentant une extension N-terminale en vue de la présentation antigénique<sup>123</sup>.

#### 1.4 Destruction des peptides antigéniques et de leurs précurseurs

Afin de prévenir l'accumulation intracellulaire des peptides générés par le protéasome, les cellules disposent d'une variété d'exo et d'endopeptidases capables d'hydrolyser rapidement les peptides en acides aminés qui seront réutilisés secondairement pour la synthèse de nouvelles protéines.

TOP (thimet oligopeptidase) est une métallo-endopeptidase cytosolique ubiquitaire largement impliquée dans cette fonction de dégradation peptidique. Son rôle a été montré avec les peptides contenant de 9 à 17 résidus, dont elle assure le clivage endoprotéolytique de façon à ce que les aminopeptidases cytosoliques puissent prendre le relais sur des peptides de plus petite taille<sup>132</sup>.

Cette dégradation pourrait être préservée en partie par la présence de chaperones (TRiC, Heat Shock Protein 70(Hsp70), Hsp90). Celles-ci sont en effet fréquemment retrouvées dans les extraits cellulaires fixées sur les peptides mais leur rôle *in vivo* n'est pas clairement établi<sup>133</sup>.

## 2. MODULATION DE LA REPONSE CTL SELON L'APPRETEMENT ANTIGENIQUE

### 2.1 Impact de l'IFN $\gamma$ sur l'apprêtement antigénique

Environ 1% des épitopes générés par le complexe ubiquitine-protéasome a une finalité immunologique. Cette proportion est augmentée en présence d'IFN $\gamma$ , inducteur d'immunoprotéasomes. Cet effet transitoire assure à la cellule une réponse immunitaire efficace en phase précoce de l'infection et agit à 3 niveaux :

- L'induction et l'assemblage des 3 sous-unités des immunoprotéasomes,  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i et  $\beta$ 5i,
- La synthèse de PA28,
- La stimulation de TAP et de certaines aminopeptidases.

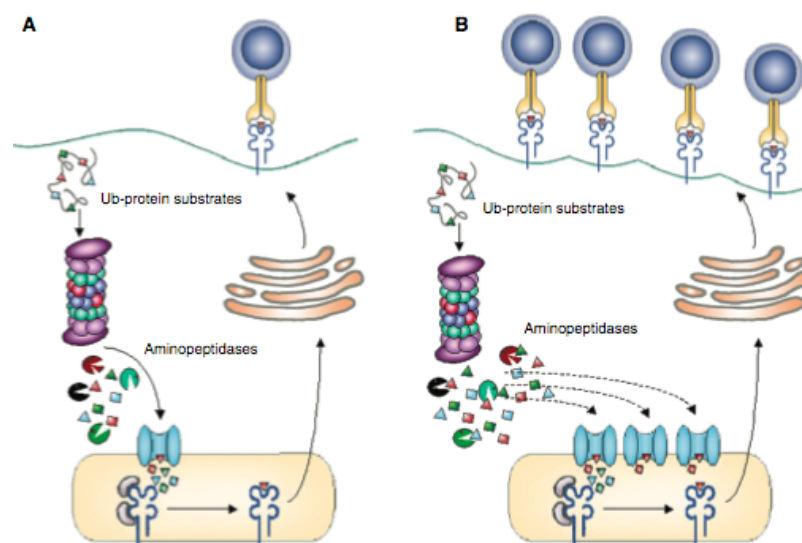
Dans les modèles viraux, il a été montré que la présentation CTL était plus efficiente en présence d'immunoprotéasomes comparativement au protéasome constitutif. Ainsi, l'apprêtement antigénique de l'épitope adénoviral E1B<sub>192-20</sub> est augmenté en présence d'immunoprotéasomes et la réponse CTL est induite plus rapidement malgré de faibles taux d'immunoprotéasomes<sup>134</sup>. Par ailleurs, il semble que les sites de clivage des immunoprotéasomes soient modifiés : ils créent les terminaisons C terminales et privilégient les extensions N-terminales facilitant ainsi le transport de l'épitope par TAP<sup>135</sup>.

L'effet de l'IFN $\gamma$  sur la réponse CTL est aussi lié au fait qu'il induit la sécrétion du facteur activateur PA28. Il a été montré dans le modèle murin que le PA28 était indispensable à l'apprêtement de certains épitopes, tel que l'épitope tyrosinase 2

(TRP<sub>2360-368</sub>) dérivé des cellules de mélanome<sup>136</sup>. En se fixant au protéasome constitutif, le PA28 induit probablement des modifications structurales au niveau de la sous-unité 20S facilitant l'hydrolyse protéique et optimisant la synthèse des épitopes.

L'IFN $\gamma$  potentialise également les autres voies de clivage des oligopeptides en activant des intermédiaires tels que TAP ou un certain nombre d'aminopeptidases tels que ERAP 1&2 et LAP<sup>115</sup>.

Il en découle un système double, avec deux cascades protéolytiques différentes pouvant aboutir à la genèse d'épitopes (**Figure 6**)<sup>137</sup>.



**Figure 6A et B :**

**Les 2 cascades protéolytiques cellulaires. D'après Strehl et al.<sup>137</sup>.**

- La cascade protéolytique constitutionnelle qui vise à dégrader et éliminer efficacement les protéines accumulées. Elle régule l'homeostasie protéique cellulaire grâce à un système catalytique performant et induit la synthèse d'un faible pourcentage d'épitopes à visée antigénique (**Figure 6A**).

- La cascade protéolytique immunologique qui est une réponse cellulaire rapide à une activation par l'IFN $\gamma$  dans l'objectif de synthétiser de grandes quantités de peptides antigéniques (**Figure 6B**).

## 2.2 Modification du contenu en protéasome et/ou peptidases

L'importance des différents composants des cascades protéolytiques a clairement été mise en évidence entre autres grâce aux modèles murins ou cellulaires par invalidation des gènes d'intérêt (Souris KO, SiRNA) ou d'inhibiteurs spécifiques du protéasome et/ou des peptidases. Hammer et al. ont ainsi montré que chez les souris déficitaires en ERAAP (aminopeptidase du ER), leur répertoire peptidique est considérablement diminué<sup>138</sup>. Dans le modèle viral de l'hépatite B, la génération d'un épitope spécifique du core (acides aminés 141-151) est conditionnée par la présence d'IFN $\gamma$ . En l'absence de cette cytokine, cet épitope n'est synthétisé qu'après adjonction de la sous-unité  $\beta$ 5i normalement contenue dans l'immunoprotéasome<sup>139</sup>. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a souligné le rôle primordial de TPPII dans la genèse de l'épitope du VIH-1, QVPLRPMTYK, contenu dans Nef (73-82)<sup>131</sup>.

Au delà de ces techniques expérimentales, des variations physiologiques de la machinerie de dégradation cellulaire ont été rapportées. Ossendorp et al. ont montré une différence d'expression des sous unités du PA28 au sein des cellules dendritiques selon leur statut de maturation<sup>140</sup>. Cette variabilité est liée en partie à la mise en balance de 2 machineries cellulaires : la forme constitutive qui est en perpétuelle compétition avec la forme inductible liée à l'IFN $\gamma$ <sup>137</sup>. L'analyse des composants du protéasome au sein d'un même tissu (cellules musculaires de rat)

confirme cette forte hétérogénéité<sup>141</sup>.

Compte tenu de l'impact important de la structure de la machinerie cellulaire sur la présentation épitopique, il est probable que la réponse CTL soit très différente selon le type cellulaire impliqué dans la présentation. Peu de données sont rapportées dans ce sens à l'exception de quelques études. Par exemple, les cellules dendritiques murines infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) induisent une réponse CTL différente de celle des lignées fibroblastiques infectées par le LCMV malgré une synthèse protéique virale équivalente<sup>142</sup>. Néanmoins, l'existence d'un apprêtement antigénique différent dans ces deux types cellulaires reste à démontrer.

Nous avons focalisé une partie de nos travaux sur l'apprêtement antigénique dans le modèle du VIH-1 au sein de deux types cellulaires classiquement infectés par le virus: les lymphocytes T CD4 et les monocytes. Ces travaux sont rapportés chapitre 3.1 et en annexe 3.

### 2.3 Présence de mutations intra ou extra-épitopiques retentissant sur l'apprêtement antigénique

Compte tenu de la spécificité du protéasome et des peptidases pour certains sites de clivage ou de certains résidus pour le transporteur TAP, des mutations survenant au sein des oligopeptides ou dans les régions flanquantes de l'épitope induisent une modification du site de clivage compromettant ainsi sa présentation.

Mo et al. ont montré que ce sont les séquences flanquantes de l'épitope sous-dominant de l'ovalbumine, KVVRFDKL, qui sont responsables de sa présentation moins efficiente comparativement à l'épitope dominant SIINFEKL et que l'adjonction

artificielle de ces séquences à SIINFEKL altère sa présentation<sup>143</sup>. L'importance de ces séquences flanquantes dans la présentation épitopique avait déjà été soulignée précédemment par Shastri et al. qui avaient démontré que le type de résidu présent en région flanquante C terminale influait de façon majeure la présentation de l'épitope SIINFEKL<sup>144</sup>.

L'impact de ces mutations dans l'apprêtement antigénique a été confirmé et impliqué dans l'échappement de certains épitopes à la réponse CTL dans d'autres modèles : c'est le cas de la protéine p53 (dite suppressive de tumeur) dans le modèle oncologique<sup>145</sup> ou des modèles infectieux.

Dans le modèle du VIH-1, des mutations naturelles intra-épitopiques perturbant l'apprêtement antigénique ont été rapportées. La mutation A146P de l'épitope de gag HLA-B\*57 ISPRTLNAW empêche le clivage de l'extension N terminale de l'oligopeptide contenant l'épitope muté qui n'est donc plus présenté<sup>11</sup>. Les mutations R69K, A81G, et H87R présentes dans les régions flanquantes de l'épitope de Nef HLA-B\*35 VPLRPMTY abolissent la réponse CTL du fait de la modification des sites de clivage à l'origine de la destruction partielle de cet épitope optimal<sup>146</sup>. L'analyse de la présentation de 2 épitopes chevauchants présentés par la molécule HLA-A3 a montré que l'apprêtement de l'épitope immunodominant est plus efficient du fait de la présence de séquences flanquantes et que ces séquences flanquantes sont capables d'optimiser la présentation d'autres épitopes sous-dominants<sup>12</sup>.

Ces travaux soulignent l'importance de l'apprêtement antigénique dans l'immunodominance de certains épitopes au même titre que l'affinité pour le CMH ou pour le TCR<sup>147</sup>.

## 2.4 Stabilité des épitopes intra-cellulaires

La dégradation protéique est un processus constant exposant les oligopeptides générés à une dégradation secondaire par les peptidases cytosoliques telles que TOP, LAP, PAS ou TPPII<sup>115</sup>. De ce fait la demi-vie intra cellulaire des épitopes à visée antigénique est relativement courte. Elle a pu artificiellement être mesurée grâce à l'analyse de peptides fluorescents injectés à l'intérieur de cellules immortalisées. Ces techniques ont conclu à des demi-vies courtes (< 7s pour des oligopeptides < 12 acides aminés)<sup>148</sup>. Mais la présence d'une extension N-terminale semble stabiliser l'épitope<sup>125,149</sup> et il s'agit d'une des raisons pour lesquelles les formes N terminales des épitopes sont considérées comme la source majeure des épitopes terminaux<sup>125</sup>. Les épitopes les plus stables sont probablement ceux qui ont le plus de chance d'être reconnus par le CMH et donc d'être présentés. Néanmoins l'impact réel de la stabilité intracellulaire des épitopes sur la qualité de la réponse CTL n'a jamais été analysé. Nous nous sommes attachés à l'étudier dans le modèle du VIH-1. Les résultats préliminaires sont présentés dans le chapitre 3.2.

## 3. QUALITE DE L'APPRETEMENT ANTIGENIQUE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIH-1

### 3.1 Impact du type cellulaire infecté par le VIH-1 : « *Differential HIV Epitope Apprêtement in Monocytes and CD4 T cells affects cytotoxic T lymphocyte recognition* »<sup>13</sup>. ANNEXE 3

Le VIH-1 infectant différents types cellulaires, nous avons souhaité évaluer la qualité

de l'apprêtement antigénique au sein de deux types cellulaires classiquement infectés par le virus : les monocytes et les lymphocytes T CD4 (LT4) à partir de :

- La mesure des activités enzymatiques de l'apprêtement antigénique du protéasome (activité chymotryptique, caspase-like et tryptique), des aminopeptidases et de TPPII,
- L'identification et l'évaluation de la cinétique et de la quantité des épitopes produits,
- L'estimation de la réponse CTL induite par les produits de dégradation évaluée par tests de lyse cellulaire.

La mesure des activités de l'apprêtement antigénique a été réalisée à l'aide de substrats fluorescents spécifiques de l'activité protéolytique à doser. Cette analyse a montré que les monocytes présentent des activités d'apprêtement au moins 2 fois supérieures à celles observées dans les LT4 à l'origine d'une lyse du substrat environ 2 fois plus rapide en terme de cinétique pour le protéasome, les aminopeptidases et TPPII.

A partir d'un essai *in vitro* mettant en jeu les extraits cellulaires contenant l'ensemble de la machinerie protéolytique, nous avons évalué le profil de dégradation de séquences oligopeptidiques du VIH-1 au sein de chacun des deux types cellulaires. Les produits de dégradation ont été identifiés par spectrométrie de masse et quantifiés par RP-HPLC. Leur antigénicité potentielle a été évaluée par tests de lyse au chrome.

Nous avons focalisé notre analyse sur 2 séquences oligopeptidiques d'intérêt :

- RWEKIRLRPGGKKKYKL (Gag15-31) contenant 3 épitopes CTL restreints par

HLA-A3 (KK9 aa 18-26, RK9 aa 20-28, RY10 aa 20-29) et 1 épitope restreint par HLA-B27 (IK9 aa 19-28)

- WKGSPAIFQSSMTKILE (RT 152-169) contenant l'épitope HLA-A3/A11 ATK9 (157-166).

La digestion du premier oligopeptide pendant 60 minutes a conduit à l'accumulation dans les LT4 de longs fragments épitopiques non accessibles aux molécules du CMH alors que dans les monocytes étaient générés des peptides de petite taille dont les 4 épitopes optimaux CTL. La quantification des produits de dégradation a confirmé la cinétique plus rapide de la protéolyse au sein des monocytes, résultat en adéquation avec les activités d'apprêtement antigénique obtenues.

Les résultats étaient similaires avec la dégradation de WKGSPAIFQSSMTKILE.

L'antigénicité des produits de dégradation a pu être évaluée par des tests de lyse au chrome ( $^{51}\text{Cr}$ ) de façon à mesurer la lyse des cellules B marquées, porteuses du HLA adéquat, pulsées avec les produits de dégradation en présence de clones cellulaires T spécifiques de l'épitope d'intérêt. Cette analyse a montré que les peptides générés dans les monocytes sont ceux qui induisent la plus forte lyse cellulaire.

Ces résultats vont dans le sens d'un apprêtement antigénique plus rapide et efficace dans les monocytes comparativement aux LT4 dans un modèle cellulaire *in vitro* de dégradation de séquences peptidiques issues du VIH-1. Ces analyses ont été réalisées à partir de cellules prélevées chez des sujets sains, l'impact de l'activation des cellules par l'IFN $\gamma$  n'a donc pas été évaluée. Nous avons effectué le même type d'analyses sur des sous-types cellulaires activés par la phytohématagglutinine A. Dans ce contexte, les activités protéolytiques du protéasome sont en moyenne 1.5 fois

plus élevées que dans les cellules non activées à l'origine d'une dégradation plus rapide de l'oligopeptide de Gag. Néanmoins, les LT4 activés gardent des activités d'apprêtement significativement inférieures aux monocytes activés. L'état d'activation des cellules n'est donc pas un facteur explicatif de la différence d'apprêtement antigénique observée au sein des deux sous-types cellulaires étudiés. Cette différence relève surtout de variations quantitatives de la machinerie de dégradation cellulaire selon le type cellulaire.

Il aurait été intéressant d'explorer de la même façon d'autres populations cellulaires d'intérêt : les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes selon leur degré de maturation cellulaire et les monocytes selon leur niveau d'expression du CD16 (conditionnant leur permissivité à l'infection) mais la nécessité de cellules en quantité très importante nous a limités dans ce type d'analyses. Il est probable que la capacité d'apprêtement antigénique est extrêmement différente au sein de ces différents types cellulaires.

La mise en évidence d'un apprêtement antigénique moins efficace dans les LT4 comparativement aux monocytes implique une production faible d'épitopes antigéniques et donc une reconnaissance moins bonne des LT4 infectés par les CTL spécifiques. Les LT4 et plus spécifiquement les LT4 quiescents constituent le principal réservoir de l'infection VIH-1<sup>150</sup>. Le niveau de reconnaissance faible de ces cellules infectées du fait d'un apprêtement antigénique peu efficient pourrait être un facteur favorisant la constitution de ces réservoirs.

## 3.2 Impact de la stabilité intracellulaire des épitopes sur l'apprêtement antigénique

### 3.2.1 Introduction

Le processus conduisant de la dégradation endogène d'une protéine à la présentation d'un épitope par une molécule du CMH I est relativement inefficace du fait de la présence de peptidases cytosoliques puissantes. On estime que 2000 copies protéiques doivent être dégradées pour qu'un seul épitope soit synthétisé et présenté<sup>149</sup>.

L'évaluation de la capacité d'un épitope à être présenté par le CMH tient compte de son accessibilité au clivage par le protéasome selon la nature biochimique de ses résidus, de sa capacité à se fixer sur TAP et de ses résidus d'ancrage définis pour chacune des molécules HLA<sup>151,152</sup>. Ces logiciels de prédiction sont disponibles sur le site IEDB ([www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org)).

Néanmoins, ils ne tiennent pas compte des peptidases du cytosol et du réticulum endoplasmique susceptibles de cliver l'épitope avant sa présentation par le CMH.

Les quelques données disponibles mesurant la demi-vie intracellulaire des épitopes concluent à une demi-vie courte<sup>149</sup> mais l'impact réel de ce paramètre sur l'antigénicité des épitopes n'a jamais été évaluée. Dans le domaine du VIH, les réponses CTL à l'égard des épitopes ont été rapportées de façon exhaustive (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>).

L'objectif de ce travail est de mesurer la demi-vie intracellulaire des épitopes CTL optimaux du VIH-1 et d'évaluer l'impact de ce paramètre sur la réponse CTL.

### 3.2.2 Matériel et Méthodes

#### - Peptides et réactifs

Les peptides hautement purifiés (pureté > 98%) proviennent de la sous-unité de fabrication des peptides du Massachusetts General Hospital, Boston, USA. Les réactifs proviennent de Sigma et les anticorps de Santa Cruz Biotechnologies.

#### - Obtention de cellules humaines

Les Buffy coats prélevés chez des volontaires anonymes sains proviennent du Massachusetts General Hospital, Boston, USA. Les PBMC sont isolés par ficoll.

#### - Dégradation in vitro des épitopes et évaluation de l'antigénicité

Le cytosol des PBMC est purifié par centrifugations répétées ou par perméabilisation à la digitonine 0.0125% tel que rapporté précédemment<sup>12,13</sup>. Les concentrations protéiques sont évaluées par le test Bio-Rad et vérifiées par Western Blot envers différentes sous-unités protéiques, actine et GAPDH.

8 nmol de peptides sont dégradées en présence de 40µg de cytosol et la quantité de peptide présente en cours de digestion est mesurée par RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) tel que rapporté antérieurement<sup>12,13</sup>.

Les peptides présents dans les produits de digestion sont purifiés, dilués dans du RPMI sans sérum puis le pH est réajusté à 7.4. Les lymphocytes B marqués au <sup>51</sup>Cr et porteurs du HLA spécifique de l'épitope d'intérêt sont pulsés avec 0.02 µg/ml de produit de digestion et mis en présence de clones CTL spécifiques de l'épitope à un ratio 4 :1. Le pourcentage de lyse est comparé avec celui obtenu par ce même test en présence de peptides longs non digérés ou d'épitopes optimaux à des

concentrations échelonnées de 0 à 0.4 µg/ml.

- Construction d'un algorithme identifiant les motifs de stabilité et prédisant les demi-vies

La prédiction est évaluée par programme de régression logistique pénalisée avec validation croisée<sup>153</sup>. Le modèle est testé par une courbe ROC (10 validations croisées) et validé après application de la pénalité L1.

- Analyse statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel GraphPad Prism version 5.

### 3.2.3 Résultats

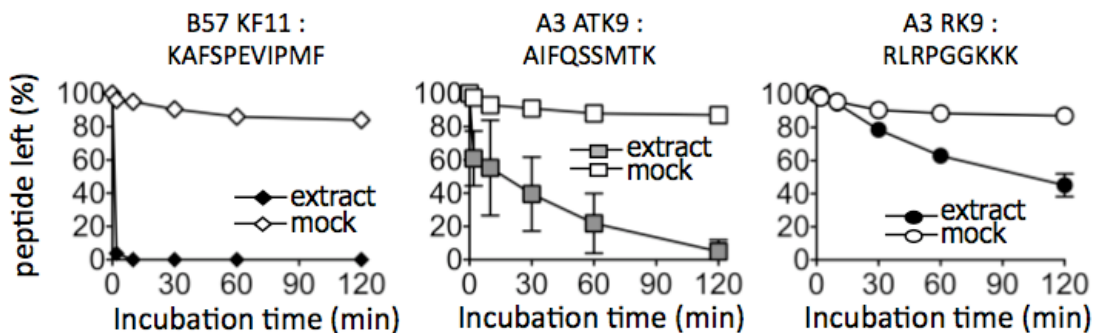
- Mesure de la stabilité intracellulaire des épitopes optimaux du VIH-1 dans les extraits cytosoliques

Des épitopes hautement purifiés sont incubés pendant 2 heures avec ou sans extraits cytosoliques de PBMC. La quantité de peptide présente au cours du temps est mesurée par RP-HPLC où chaque peptide est défini par un pic dont l'aire sous la courbe (AUC) est proportionnelle à la quantité de peptide. Une valeur de 100 % est assignée au peptide au temps 0 et la quantité de peptides présente à 2, 10, 30, 60 et 120 minutes est calculée à partir de l'AUC.

Nous nous sommes initialement intéressés à la stabilité intracellulaire de 3 épitopes classiquement décrits au cours de l'infection par le VIH-1 :

- HLA-B57 KF11 (KAFSPEVIPMF, aa 30-40 dans Gag p24)
- HLA-A3/A11 ATK9 (AIFQSSMTK, aa 158-166 dans RT)
- HLA-A3 RK9 (RLRPGGKKK, aa 20-28 dans Gag p17)

Les résultats sont présentés **Figure 7**.



**Figure 7 : Stabilité intracellulaire de 3 épitopes optimaux**

Les épitopes HLA-B57 KF11 (losanges), HLA-A3/A11 ATK9 (carrés) et HLA-A3 RK9 (cercles) sont mis en présence d'extraits de PBMC (symboles blancs) ou de buffer (symboles gris ou noirs). La dégradation des épitopes optimaux est évaluée par la quantification de l'épitope présent à 2, 10, 30, 60 et 120 minutes par RP-HPLC.

Le peptide KF11 est rapidement dégradé en présence de cytosol et n'est plus détecté après 2 minutes d'incubation alors que le peptide RK9 est extrêmement stable avec près de 45% de peptide présent après 120 minutes d'incubation. Le peptide ATK9 présente un profil intermédiaire avec 61% de peptide détecté à 2 minutes, 21.5% à 60 minutes et une dégradation complète à 120 minutes.

Ces résultats suggèrent une grande variabilité de la demi-vie intracellulaire des épitopes. Ils sont indépendants du typage HLA de classe I des PBMC (résultats non présentés), éliminant l'existence d'un trappage des épitopes stables par les molécules HLA.

- Evaluation de l'antigénicité des épitopes et de leurs produits de dégradation par un test de lyse au  $^{51}\text{Cr}$

Nous avons souhaité confronter nos résultats de stabilité intra-cellulaire à un test d'antigénicité évalué par lyse cellulaire.

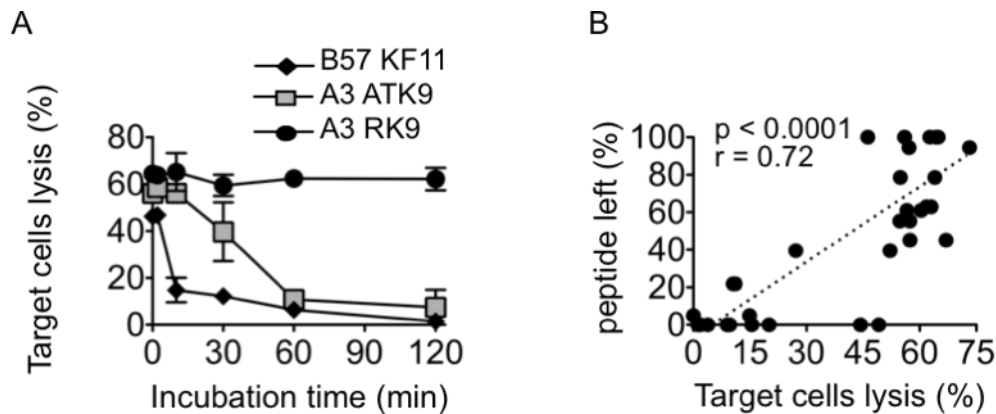
Les épitopes CTL correspondent aux épitopes présentant les caractéristiques optimales à la liaison aux molécules HLA de classe I. La dégradation de ces épitopes doit donc être corrélée à une diminution de cette réponse CTL spécifique.

Les peptides obtenus aux temps de dégradation 2, 10, 30, 60 et 120 minutes ont été purifiés et utilisés dans un test de lyse impliquant des lymphocytes B marqués au  $^{51}\text{Cr}$  et des clones CTL spécifiques de chacun des épitopes testés.

Les résultats sont présentés **Figure 8A**.

KF11, ATK9 et RK9 ont une avidité équivalente pour leurs clones CTL respectifs. L'antigénicité KF11 décroît brutalement pendant les 10 premières minutes correspondant à la phase de dégradation de l'épitope avec au temps 10 minutes un pourcentage de lyse de 18% se négativant au temps 120 minutes. RK9 présente une antigénicité forte et stable se maintenant au dessus de 60% de lyse sur les 120 minutes de test. L'antigénicité de ATK9 présente un profil intermédiaire avec une antigénicité supérieure à 40 % de lyse les 30 premières minutes diminuant ensuite jusqu'à la négativation.

Afin de démontrer la complète corrélation entre la stabilité intracellulaire obtenue par RP-HPLC et l'antigénicité définie par le taux de lyse cellulaire, nous avons comparé pour chacun des peptides ces 2 valeurs aux différents temps (**Figure 8B**). La corrélation est puissante ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.72$ , test de Spearman).



**Figure 8 : La dégradation des épitopes optimaux est corrélée avec leur antigénicité**

- A.** Les produits de dégradation sont utilisés pour un test de lyse cellulaire mettant en jeu des cellules B marquées au  $^{51}\text{Cr}$  et possédant le HLA adéquat et des clones CTL spécifiques de l'épitope d'intérêt.
- B.** Le pourcentage de peptide restant à chaque time point est corrélé au pourcentage de lyse cellulaire.

- La demi-vie intracellulaire des épitopes optimaux du VIH-1 est hautement variable

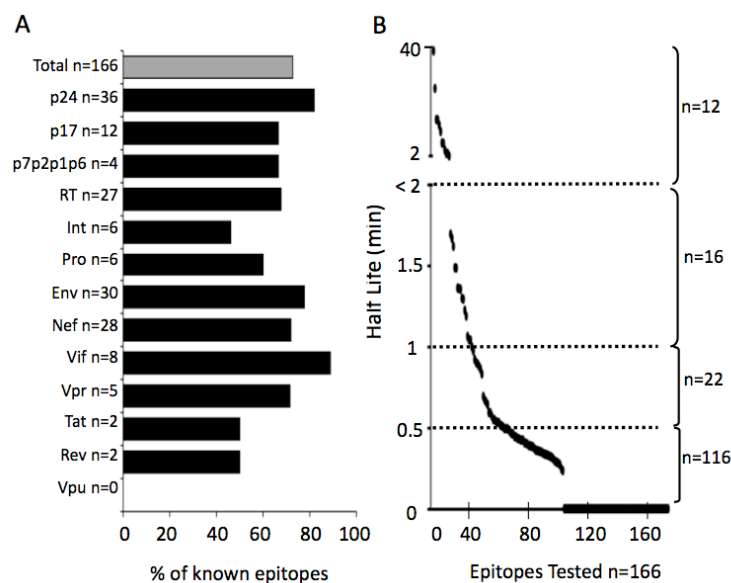
La base de données de Los Alamos rapporte la liste des épitopes optimaux VIH-1, correspondant à ceux décrits dans des séquences de sous-types viraux de type B et accessible sur le lien : <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>.

Nous avons pu calculer la demi-vie intracellulaire de 166 épitopes optimaux couvrant 50 à 90% des épitopes décrits dans chacune des protéines du VIH-1 à l'exception de Vpu dont les 4 épitopes optimaux présentaient un profil de dégradation RP-HPLC ininterprétable (**Figure 9A**).

La demi-vie de ces épitopes est calculée à partir d'une régression non linéaire du profil de dégradation obtenu sur 30 minutes sur au minimum 3 expériences indépendantes et interprétables pour chacun des épitopes.

Cette demi-vie est hautement variable, avec des valeurs comprises entre 30 et

0.0037 minutes (**Figure 9B**). La majorité des épitopes (n=116 soit 69.9%) présente une demi-vie comprise entre 0.22 et 30 secondes ce qui est en adéquation avec les données de la littérature<sup>148,149</sup>. 50 épitopes (soit 30.1%) ont une stabilité supérieure à 30s dont 12 d'entre eux (7.2%) ont une demi-vie exceptionnellement longue, supérieure à 2 minutes.



**Figure 9 : La demi-vie de la majorité des épitopes optimaux du VIH-1 est hautement variable**

- A. Distribution des 166 épitopes optimaux du VIH-1 testés dans les différentes protéines
- B. La demi-vie (minutes, axe des ordonnées) des 166 épitopes (axe des abscisses) est calculée par régression non-linéaire du profil de dégradation obtenu sur 30 minutes à partir d'extraits de PBMC (moyenne de au moins 3 expériences indépendantes).

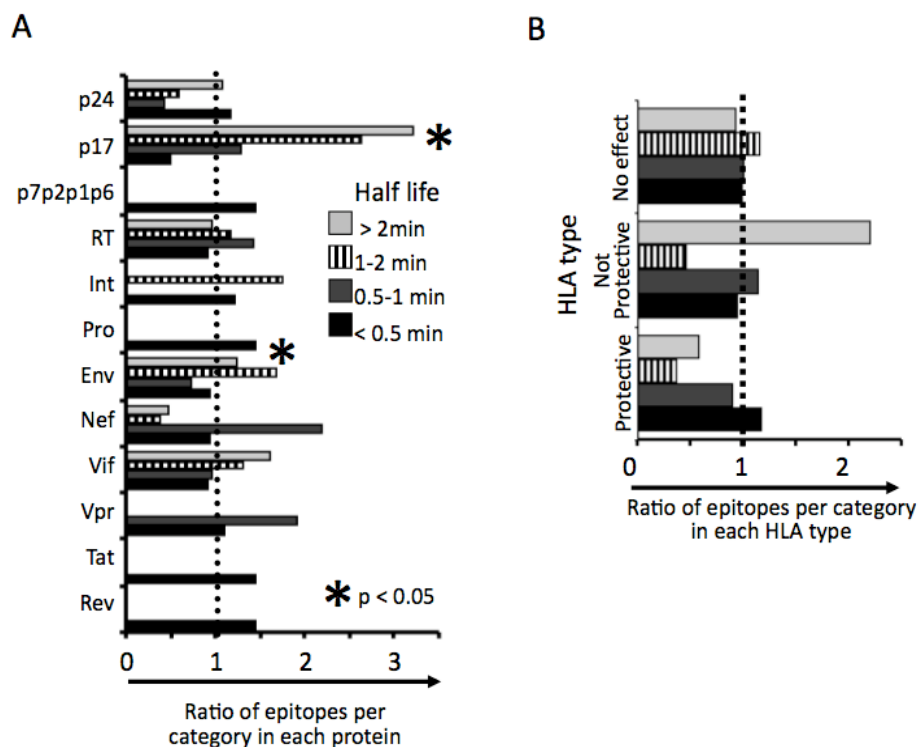
#### - Caractéristiques protéomiques des épitopes selon leur demi-vie intracellulaire

Nous avons analysé la distribution des épitopes selon leur demi-vie intracellulaire au sein des différentes protéines HIV et selon le type de HLA présentant l'épitope. Les épitopes ont été classés en 4 catégories en fonction de la valeur de la demi-vie : > 2

minutes (stables), de 1 à 2 minutes, de 0.5 à 1 min et < 0.5 min (instables). De façon à comparer les résultats, nous avons calculé pour chaque catégorie un ratio entre le pourcentage d'épitopes dans chaque catégorie pour une protéine donnée (ou un HLA donné) et le pourcentage global d'épitopes de cette même catégorie. Un ratio supérieur à 1 traduit un enrichissement de la protéine ou du HLA au sein d'une catégorie d'épitopes.

Les résultats de l'analyse selon les protéines VIH-1 sont représentés **Figure 10A**. Gag, Env et Vif sont enrichis en épitopes stables alors que p24, p7p2p1p6, Int, Pro, Vpr, Tat et Rev sont enrichis en épitopes instables. L'analyse par comparaisons multiples confirme la significativité de l'enrichissement en épitopes stables dans p17 et en épitopes instables dans Pro.

L'analyse de la distribution des épitopes selon la molécule HLA retrouve significativement plus d'épitopes stables présentés par l'allèle HLA-A3. Aucun enrichissement spécifique n'est mis en évidence selon le type de HLA : protecteur (HLA-B57, B27, B51), non protecteur (HLA-B35, B08) ou neutre (autres HLA) (**Figure 10B**). Il existe toutefois une tendance à un enrichissement en épitopes stables parmi les HLA non protecteurs.



**Figure 10 : Caractéristiques protéomiques des épitopes selon leur demi-vie intracellulaire**

Les épitopes sont groupés en 4 catégories selon la demi-vie : > 2 min (stable), entre 1 et 2 minutes, entre 0.5 et 1 minute et < 0.5 min (instable).

- A.** Ratio entre le % d'épitopes de chaque catégorie dans chaque protéine et le % global d'épitopes dans cette même catégorie. \* :  $p < 0.05$  (Mann Whitney test)
- B.** Ratio entre le % d'épitopes de chaque catégorie dans chaque groupe de HLA et le % global d'épitopes dans cette même catégorie. Les HLA protecteurs désignent les HLA- B57, B27 et B51, les non protecteurs les HLA-B35 et B08 et les neutres tous les autres. \* :  $p < 0.05$  Mann Whitney test)

- La stabilité des épitopes est définie par des motifs spécifiques

Nous avons ensuite cherché à identifier les facteurs définissant la stabilité intracellulaire. Notre hypothèse était que les séquences peptidiques des épitopes pourraient être un de ces facteurs car elles impactent sur la capacité d'hydrolyse des peptidases cytosoliques.

Nous avons réalisé une analyse informatique des 166 séquences de façon à identifier d'éventuels motifs impliqués dans la stabilité.

Chaque épitope a été scindé en 3 parties : début et fin comprenant 2 à 3 acides aminés chacun et une partie médiane avec 5 à 6 acides aminés. Les critères utilisés pour la recherche de motifs d'intérêt étaient : la taille, la charge et l'hydrophobicité des acides aminés pris de façon individuelle ou par paires ou triplets (**Table 1**).

| RESIDUES | AMINO ACID FEATURES |           |          |        |             |       |        |       |          |          |               |
|----------|---------------------|-----------|----------|--------|-------------|-------|--------|-------|----------|----------|---------------|
|          | cyclic              | aliphatic | aromatic | buried | hydrophobic | large | medium | small | negative | positive | charged polar |
| ala A    |                     | *         |          | *      | *           |       |        | *     |          |          |               |
| arg R    |                     |           |          |        |             | *     |        |       |          | *        | *             |
| asn N    |                     |           |          |        |             |       | *      |       |          |          | *             |
| asp D    |                     |           |          |        |             |       | *      |       | *        | *        | *             |
| cys C    |                     |           |          | *      |             |       | *      |       |          |          | *             |
| glu E    |                     |           |          |        | *           |       |        |       | *        | *        | *             |
| gln Q    |                     |           |          |        | *           |       |        |       |          |          | *             |
| gly G    |                     | *         |          |        | *           |       |        | *     |          |          |               |
| his H    | *                   |           | *        |        | *           |       |        |       |          | *        | *             |
| ile I    |                     | *         |          | *      | *           | *     |        |       |          |          |               |
| leu L    |                     | *         |          | *      | *           | *     |        |       |          |          |               |
| lys K    |                     |           |          |        |             | *     |        |       |          | *        | *             |
| met M    |                     |           |          | *      | *           | *     |        |       |          |          |               |
| phe F    | *                   |           | *        | *      | *           | *     |        |       |          |          |               |
| pro P    | *                   |           |          |        | *           |       | *      |       |          |          |               |
| ser S    |                     |           |          |        |             |       |        | *     |          |          | *             |
| thr T    |                     |           |          |        |             |       | *      |       |          |          | *             |
| trp W    | *                   |           | *        | *      | *           | *     |        |       |          |          |               |
| tyr Y    | *                   |           | *        |        | *           | *     |        |       |          |          |               |
| val V    |                     | *         |          | *      | *           |       | *      |       |          |          |               |

**Table 1 : Caractéristiques des acides aminés utilisées dans l'analyse des motifs de stabilité**

L'analyse statistique a fait appel à un programme de régression logistique pénalisée avec validation croisée <sup>153</sup>. Les 166 séquences peptidiques ont été compartimentées dans 10 groupes. Pour chaque répartition 90/10, 90% des séquences observées avec leur demi-vie étaient utilisées pour identifier les motifs des épitopes stables (demi-vie > 2 minutes) et instables (demi-vie < 30s), les 10% des séquences restantes étaient utilisées pour tester et valider le modèle. Cette analyse a été

répétée 10 fois de façon à permuter tous les sets d'analyse et de test. Cette analyse a été réalisée par Microsoft Research.

1628 motifs d'intérêt ont été identifiés. L'impact de ces motifs est désigné par une valeur positive si le motif est stable et par une valeur négative si le motif est instable.

Les motifs aux valeurs positives ou négatives les plus élevées sont désignés sur la

**Table 2** (ci-dessous)

| Beginning 2                      |   |        | Middle 2 (n amino acids) |                                    |  |         |  |  | End 2 |   |   |   |    |
|----------------------------------|---|--------|--------------------------|------------------------------------|--|---------|--|--|-------|---|---|---|----|
| Beginning 3                      |   |        | Middle 3 (n amino acids) |                                    |  |         |  |  | End 3 |   |   |   |    |
| N-                               | 1 | 2      | 3                        |                                    |  |         |  |  |       | 3 | 2 | 1 | C- |
| Stability features               |   | Weight |                          | Unstability features               |  | Weight  |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium in end3                   |   | 1.6399 |                          | Polar,small in epitope             |  | -1.7695 |  |  |       |   |   |   |    |
| Positive in end2                 |   | 1.6163 |                          | Buried,buried in end3              |  | -1.6743 |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium,positive in end3          |   | 1.5648 |                          | Polar,hydrophobic in end3          |  | -1.5956 |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium,large in end3             |   | 1.5222 |                          | Buried,buried in end2              |  | -1.4454 |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium,charged in end3           |   | 1.4407 |                          | Polar,hydrophobic in end2          |  | -1.3984 |  |  |       |   |   |   |    |
| Aliphatic,large in begin3        |   | 1.4172 |                          | Cyclic,large in middle2            |  | -1.3936 |  |  |       |   |   |   |    |
| Aromatic,medium in epitope       |   | 1.4159 |                          | Aromatic,large in epitope          |  | -1.3607 |  |  |       |   |   |   |    |
| Charged in end2                  |   | 1.3791 |                          | Buried,hydrophobic in middle2      |  | -1.3528 |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium,polar in end2             |   | 1.3346 |                          | Large,buried in end3               |  | -1.3428 |  |  |       |   |   |   |    |
| Large,buried in begin3           |   | 1.2783 |                          | Large,small in begin3              |  | -1.2993 |  |  |       |   |   |   |    |
| Charged,large in middle3         |   | 1.2510 |                          | Charged in begin3                  |  | -1.2893 |  |  |       |   |   |   |    |
| Buried,large in begin3           |   | 1.2137 |                          | Buried,buried in epitope           |  | -1.2850 |  |  |       |   |   |   |    |
| Polar,aliphatic in middle2       |   | 1.2030 |                          | Hydrophobic,hydrophobic in middle2 |  | -1.2597 |  |  |       |   |   |   |    |
| Cyclic,aliphatic in end3         |   | 1.1971 |                          | Small,positive in epitope          |  | -1.2344 |  |  |       |   |   |   |    |
| Negative,large in middle3        |   | 1.1868 |                          | Large,small in epitope             |  | -1.2211 |  |  |       |   |   |   |    |
| Aliphatic,hydrophobic in middle3 |   | 1.1744 |                          | Medium,hydrophobic in end2         |  | -1.2128 |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium,charged in end2           |   | 1.1472 |                          | Medium,buried in end2              |  | -1.1975 |  |  |       |   |   |   |    |
| Medium,positive in end2          |   | 1.1472 |                          | Cyclic,large in epitope            |  | -1.1833 |  |  |       |   |   |   |    |
| L in middle2                     |   | 1.1296 |                          | Negative in begin3                 |  | -1.1833 |  |  |       |   |   |   |    |
| Cyclic,aliphatic in end2         |   | 1.1220 |                          | KA in epitope                      |  | -1.1451 |  |  |       |   |   |   |    |
| Polar,positive in end3           |   | 1.1045 |                          | Charged,hydrophobic in epitope     |  | -1.1206 |  |  |       |   |   |   |    |
| Aliphatic,aliphatic in middle3   |   | 1.0913 |                          | Hydrophobic,buried in middle2      |  | -1.1094 |  |  |       |   |   |   |    |
| Aliphatic,polar in middle2       |   | 1.0783 |                          | Small,large in end3                |  | -1.1076 |  |  |       |   |   |   |    |
| V in begin3                      |   | 1.0670 |                          | Hydrophobic,aromatic in epitope    |  | -1.0920 |  |  |       |   |   |   |    |
| Large,buried in begin2           |   | 1.0413 |                          | Cyclic,large in begin3             |  | -1.0857 |  |  |       |   |   |   |    |
|                                  |   |        |                          | I in middle3                       |  | -1.0555 |  |  |       |   |   |   |    |

**Table 2 : Principaux motifs de stabilité et d'instabilité rapportés par l'analyse informatique (programme de régression logistique).**

*Les séquences peptidiques ont été divisées par 3 pour l'analyse :*

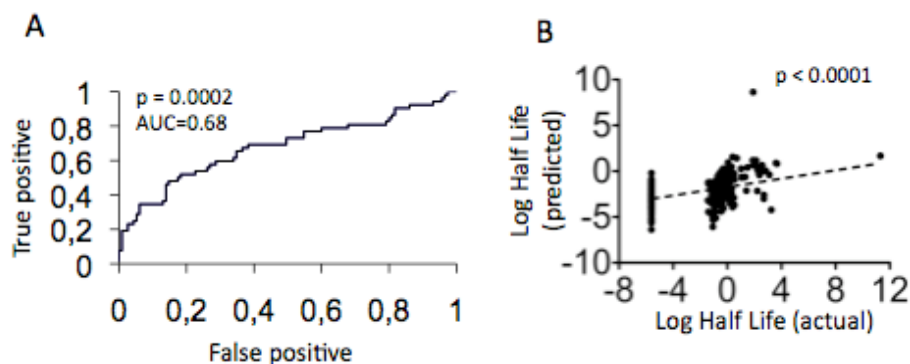
*Beginning 2/3 selon le nombre d'acides aminés*

*End 2/3 selon le nombre d'acides aminés*

*Middle entre les 2 sections définies.*

*La valeur associée au motif désigne son degré de stabilité (négative pour les épitopes instables et positive pour les épitopes stables).*

A partir de l'identification de ces motifs, une modélisation mathématique de la demi-vie intracellulaire a pu être établie. La validité de ce modèle est attestée par la courbe ROC (AUC = 0.68,  $p = 0.0002$ ) et la comparaison des valeurs prédites des demi-vies des 166 épitopes avec les valeurs déterminées expérimentalement ( $p < 0.0001$ , Test de Spearman) (**Figure 11**).

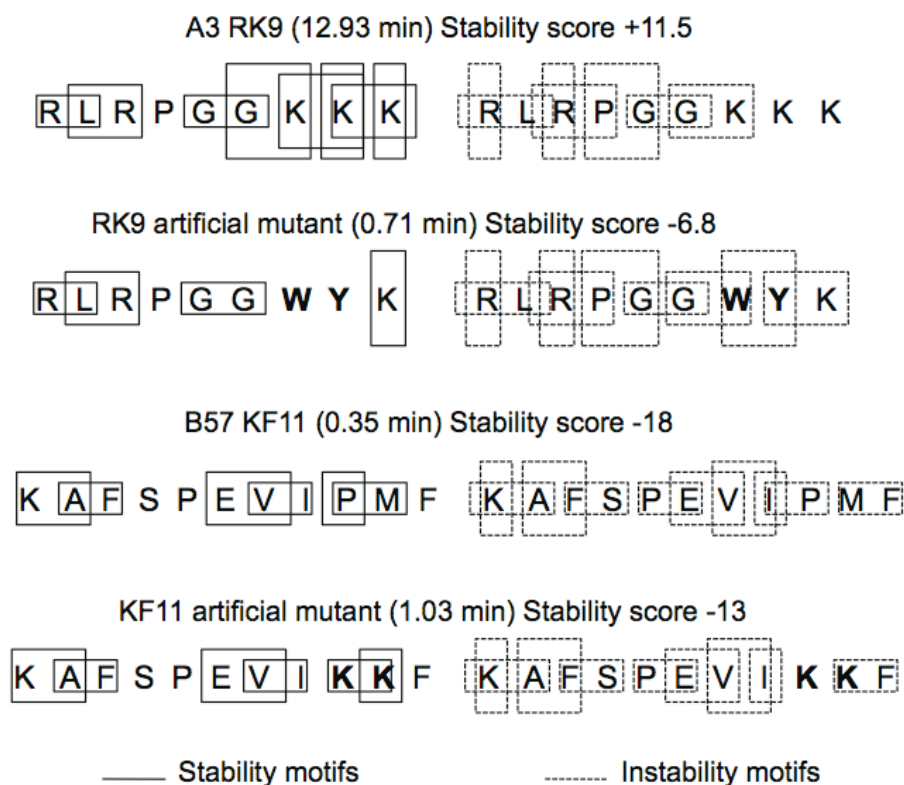


**Figure 11 : Validation du modèle mathématique de prédiction de la demi-vie des épitopes**

- A.** Courbe ROC mesurant la proportion de vrais positifs comparativement aux faux positifs définis par le modèle.
- B.** Corrélation de la valeur de la demi-vie prédite par le modèle et la valeur déterminée expérimentalement. Les demi-vies sont exprimées en valeurs logarithmiques.

De façon à mieux visualiser les différences en terme de nombre et de types de motifs

présents dans les séquences, nous avons calculé un score de stabilité correspondant à la somme des motifs rapportés table 2 présents dans les séquences. Ainsi RK9 dont la demi-vie expérimentale est de 12.93 minutes a un score de +11.5 alors que KF11, plus instable (demi-vie de 0.35 minutes) a un score de -18 (**Figure 12**).



**Figure 12 : Identification des motifs de stabilité et d'instabilité dans des épitopes optimaux du VIH-1 et des mutants artificiels.**

Les traits pleins entourent les motifs de stabilité, les pointillés désignent les motifs d'instabilité. Le score correspond à la somme des différents motifs selon les valeurs rapportées Table 2.

- La demi-vie intracellulaire des épitopes du VIH-1 est modulable

Afin de valider le modèle mathématique de prédiction des épitopes et de démontrer l'importance des motifs peptidiques, nous avons créé des mutants artificiels de façon

à déstabiliser les épitopes naturellement stables.

L'introduction de 2 mutations (K3W et K8Y) dans l'épitope stable HLA-A3 RK9 induit une diminution drastique de sa demi-vie à 0.71 minutes versus 12.93 minutes initialement ce qui se traduit dans le modèle prédictif par un score de -6.8 versus +11.5 (**Figure 12**, haut de la figure).

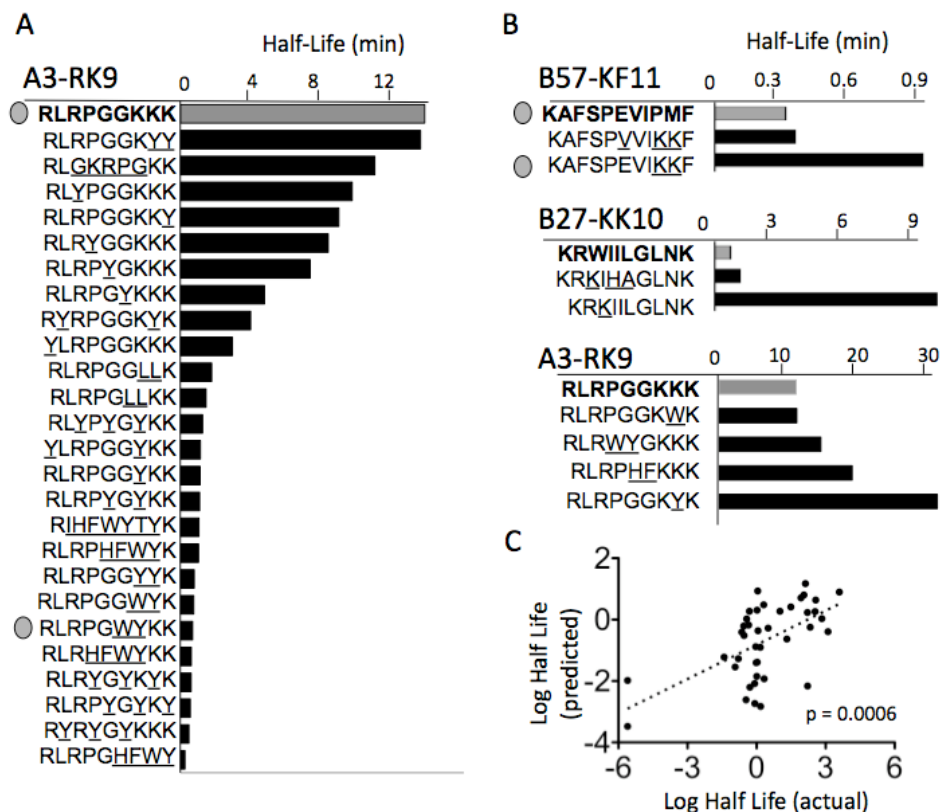
25 mutants artificiels de RK9, contenant de 1 à 7 mutations, ont été testés. Leur demi-vie a été mesurée expérimentalement et varie de 0.24 à 12.9 minutes (**Figure 13A**) selon le type et la position de la mutation.

Nous avons secondairement introduit des mutations artificielles de façon à augmenter la stabilité des épitopes.

L'introduction de 2 mutations (P9K et M10K) dans l'épitope instable B57-KF11 a permis d'augmenter sa stabilité avec une demi-vie s'élevant à 1.03 minutes versus 0.35 minutes pour la forme non mutée. L'épitope muté présente moins de motifs d'instabilité ce qui se traduit par un score de -13 versus -18 pour la forme non mutée (**Figure 12**, bas de la figure).

Nous avons généré 4 variants pour les épitopes instables B57-KF11 et B27-KK10 et 4 variants pour l'épitope stable A3-RK9. Ces variants ont tous une demi-vie intracellulaire supérieure à l'épitope non muté (**Figure 13B**).

La comparaison des demi-vies expérimentales des 33 épitopes artificiellement mutés avec leur demi-vie prédite confirme l'excellente corrélation entre les deux valeurs avec un  $p = 0.0006$  (Spearman test) (**Figure 13C**).



**Figure 13 : La stabilité des épitopes du VIH-1 peut être modulée**

- A.** Demi-vie de 25 mutants (barres noires) de HLA-A3 RK9 (barre grise). Les mutations intra épitopiques sont soulignées.
- B.** Demi-vie de 8 mutants de B57-KF11, B27-KK10 et A3-RK9. Les mutants sont désignés par des barres grises, les épitopes sauvages sont désignés par des barres noires.
- C.** Corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites des demi-vies des épitopes mutés. Les demi-vies sont exprimées en valeur logarithmique.

Les demi-vies expérimentales ont été déterminées à partir de 3 expériences indépendantes au moins. Les épitopes marqués d'un point sont ceux qui apparaissent également Figure 12.

### 3.2.4 Discussion et conclusion

L'apprêtement antigénique fait intervenir de multiples peptidases à l'origine d'une dégradation rapide peptidique. Les déterminants conduisant de la synthèse des épitopes antigéniques à leur présentation par les molécules du CMH I sont encore mal déterminés.

Ce travail nous a permis d'évaluer l'impact de la séquence peptidique sur la qualité de la présentation, l'hypothèse étant qu'une séquence non clivable par les peptidases sera plus stable dans la cellule et donc plus facilement captée par les molécules HLA.

Nous avons montré par le biais d'un test de dégradation cytosolique de trois épitopes optimaux du VIH-1 (HLA-B57 KF11, HLA-A3/A11 ATK9 et HLA-A3-RK9) que leur profil de dégradation est différent et qu'il est corrélé à leur degré d'antigénicité évalué par un test de lyse au  $^{51}\text{Cr}$ . Ces résultats valident l'importance de la demi-vie intracellulaire dans la modulation de la réponse CTL, au même titre que l'affinité pour la molécule HLA et le TCR.

Le modèle du VIH-1 nous a permis d'évaluer la demi-vie intracellulaire d'un large nombre d'épitopes représentatifs des épitopes CTL rapportés dans cette infection (166 épitopes soit 79% des épitopes totaux). Une variabilité importante de ce paramètre a pu être constatée avec des épitopes qualifiés de stables lorsque la demi-vie est supérieure à 2 minutes, instables au dessous de 0.5 minutes et intermédiaires entre les 2 seuils. 69.8 % des épitopes de notre série sont instables, en adéquation avec ce qui a déjà été rapporté dans la littérature<sup>129,149</sup>. 12 épitopes (soit 7.3%) apparaissent exceptionnellement stables. Ils sont majoritairement retrouvés dans p17 qui est une protéine reconnue comme très immunogène au cours du VIH-1, car exprimée précocement et en grandes quantités<sup>51</sup>. La stabilité des épitopes de Gag pourrait ainsi apporter un argument complémentaire à l'immunogénicité de cette protéine.

L'analyse du profil de stabilité des épitopes selon le caractère protecteur, non protecteur ou neutre des molécules HLA n'a pas montré d'enrichissement significatif, ce qui suggère l'importance d'autres facteurs associés dans l'efficacité de la

réponse CTL. Par contre, nous avons observé un net enrichissement des molécules HLA-A3 en épitopes stables. Ces allèles se caractérisent par un résidu d'ancrage C terminal positivement chargé peut être moins accessible à l'hydrolyse par les peptidases.

La confrontation informatique des séquences des 12 épitopes stables avec celles des 116 épitopes instables a objectivé l'existence de motifs peptidiques (selon leurs caractéristiques biochimiques) étroitement associés au degré de stabilité de ces épitopes. Cette analyse a confirmé que la présence d'un acide aminé positivement chargé en position C terminale est un motif de stabilité. 1628 motifs influant positivement ou négativement sur la stabilité ont été identifiés.

La validation de ces motifs a pu être confirmée par la création de peptides mutants artificiels à partir d'épitopes connus comme stables ou instables. La stabilité de l'épitope HLA-A3 RK9 a ainsi pu être complètement modulée au travers de 29 épitopes mutants faisant varier la demi-vie de 0.24 min à 36.51 min. Il avait déjà été démontré précédemment que la qualité de l'apprêtement antigénique pouvait être modifiée selon les séquences flanquantes de l'épitope<sup>12</sup>. Nous suggérons un nouveau mécanisme de modulation de la réponse CTL qui pourrait être exploité dans le contexte des thérapeutiques vaccinales immunogènes T. Dans ce contexte, notre modèle mathématique prédictif de la demi-vie intracellulaire des épitopes prend toute sa place.

Le mécanisme par lequel les motifs peptidiques confèrent la stabilité aux épitopes n'est pas clairement établi. Notre hypothèse première est qu'ils bloquent l'accessibilité des peptidases cytosoliques mais la méconnaissance exhaustive de leur site de clivage ne permet pas de confirmer cette hypothèse. Il est possible que la conformation tridimensionnelle induite par ces séquences peptidiques les protègent

de la dégradation ou favorisent l'accrochage de protéines chaperones. Dans le modèle murin, il a été montré que les agrégats de peptides viraux, plus stables, induisent des réponses CTL efficaces<sup>154</sup>. Les molécules chaperones, telles que TRiC, GRP94, HsP70 et Hsp 90, en se liant aux peptides pourraient leur conférer une meilleure stabilité optimisant ainsi leur antigénicité<sup>155</sup>.

Ces travaux font de la demi-vie intracellulaire des épitopes un nouveau facteur d'immunogénicité dont il faut tenir compte dans un contexte de thérapies immunologiques visant à optimiser la réponse cellulaire T.

## CONCLUSION

La mise au point de stratégies vaccinales efficaces repose sur la connaissance parfaite des mécanismes viraux et immunologiques impliqués dans la physiopathologie de l'infection par le VIH. Plus de 20 ans se sont écoulés depuis la découverte du VIH et la mise en place des premiers essais vaccinaux. Depuis, alors que des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de l'infection, l'espoir de parvenir à mettre au point un vaccin préventif s'est progressivement amenuisé.

Des découvertes très récentes dans le monde des anticorps neutralisants et l'essai vaccinal Thai représentent néanmoins des avancées exaltantes pour la communauté scientifique.

Dans cette thèse nous nous sommes focalisés sur la réponse CTL au cours de l'infection par le VIH-1, et plus spécifiquement à deux facteurs potentiellement impliqués dans la variabilité de cette réponse : le polymorphisme génétique du VIH-1 et l'apprêtement antigénique des épitopes.

Notre étude menée dans une population Vietnamiennne infectée de Ho Chi Minh Ville et de la région du delta du Mekong nous a permis de décrire le sous-type du VIH-1 circulant, son polymorphisme et l'impact de ce polymorphisme sur la reconnaissance HLA. Nos résultats concluent à la prédominance du CRF01\_AE dans les deux régions. Le typage HLA de classe I des Vietnamiens est homogène et bien différencié de celui des populations avoisinantes. Le CRF01\_AE se caractérise par un polymorphisme intra épitopique marqué comparativement aux souches de sous-

type B, à l'origine au sein de cette population, d'une diminution de l'affinité de ces épitopes pour leur molécule HLA de classe I. Ces résultats vont dans le sens d'une altération de la réponse CTL des patients Vietnamiens à l'égard du CRF01\_AE et pourrait expliquer en partie la large prédominance de ce sous-type au Vietnam.

Ces résultats sont cependant basés sur des scores prédictifs relatifs aux capacités de clivage du peptide par le protéasome (Proteasome Score), à l'affinité de l'épitope pour TAP (TAP score) et le CMH (MHC Score). Ces scores ne tiennent pas compte des nombreuses autres étapes impliquées dans l'apprêtement antigénique.

Nous avons cherché à préciser quel était l'impact de l'apprêtement antigénique dans la variabilité de la réponse CTL. Deux nouveaux facteurs de modulation de cette réponse ont été identifiés : le type de cellule impliquée dans l'apprêtement et la stabilité intracellulaire des épitopes. Ils méritent des investigations plus poussées, l'ensemble des mécanismes aboutissant à la présentation d'un épitope optimal étant encore mal compris. Il convient d'une part de confronter nos résultats à des manipulations d'apprêtement endogène, la plupart de nos données étant obtenues à partir d'extraits cytosoliques. D'autre part, l'impact réel des chaperones dans la protection des épitopes envers la dégradation doit être analysé. Une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans la stabilité des épitopes est en effet nécessaire à l'optimisation des stratégies d'immunothérapie cellulaire T.

Les différents facteurs rapportés dans cette thèse contribuent à illustrer l'extrême complexité de l'infection par le VIH inhérente à la grande variabilité du virus et à l'hétérogénéité des populations.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Lazaro E, Theodorou I, Legrand E, et al. Sequences of clustered epitopes in Gag and Nef potentially presented by predominant class I human leukocyte antigen (HLA) alleles A and B expressed by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients in Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:586-91.
2. WHO. UNAIDS WHO AIDS epidemic update 2009.
3. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Science* 1999;283:857-60.
4. Fellay J, Shianna KV, Ge D, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science* 2007;317:944-7.
5. Leslie A, Matthews PC, Listgarten J, et al. Additive contribution of HLA class I alleles in the immune control of HIV-1 infection. *J Virol* 2010;84:9879-88.
6. Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2006;107:4781-9.
7. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 2004;432:769-75.
8. Kaufmann DE, Walker BD. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* 2009;182:5891-7.
9. Lan NT, Recordon-Pinson P, Hung PV, et al. HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large predominance of CRF01\_AE and presence of major resistance mutations to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:925-8.
10. Phan TT, Ishizaki A, Phung DC, Bi X, Oka S, Ichimura H. Characterization of HIV type 1 genotypes and drug resistance mutations among drug-naïve HIV type 1-infected patients in Northern Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26:233-5.
11. Draenert R, Le Gall S, Pfaffert KJ, et al. Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med* 2004;199:905-15.
12. Le Gall S, Stamegna P, Walker BD. Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* 2007;117:3563-75.
13. Lazaro E, Godfrey SB, Stamegna P, et al. Differential HIV epitope processing in monocytes and CD4 T cells affects cytotoxic T lymphocyte recognition. *J Infect Dis* 2009;200:236-43.
14. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650-5.
15. Karlsson AC, Iversen AK, Chapman JM, et al. Sequential broadening of CTL responses in early HIV-1 infection is associated with viral escape. *PLoS One* 2007;2:e225.
16. Brumme ZL, John M, Carlson JM, et al. HLA-associated immune escape pathways in HIV-1 subtype B Gag, Pol and Nef proteins. *PLoS One* 2009;4:e6687.
17. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 2003;54:535-51.
18. Schellens IM, Borghans JA, Jansen CA, et al. Abundance of early functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells does not predict AIDS-free survival time. *PLoS One* 2008;3:e2745.
19. Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, et al. Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *PLoS Med* 2008;5:e100.
20. Almeida JR, Price DA, Papagno L, et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8<sup>+</sup> T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 2007;204:2473-85.
21. Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 2009;113:3978-89.
22. Critchfield JW, Young DH, Hayes TL, et al. Magnitude and complexity of rectal mucosa HIV-1-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses during chronic infection reflect clinical status. *PLoS One* 2008;3:e3577.
23. Derby M, Alexander-Miller M, Tse R, Berzofsky J. High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J Immunol* 2001;166:1690-7.
24. Chen H, Piechocka-Trocha A, Miura T, et al. Differential neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) replication in autologous CD4 T cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 2009;83:3138-49.

25. Vingert B, Perez-Patrigueon S, Jeannin P, et al. HIV controller CD4+ T cells respond to minimal amounts of Gag antigen due to high TCR avidity. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000780.
26. Douek DC, Betts MR, Brenchley JM, et al. A novel approach to the analysis of specificity, clonality, and frequency of HIV-specific T cell responses reveals a potential mechanism for control of viral escape. *J Immunol* 2002;168:3099-104.
27. Stone JD, Chervin AS, Kranz DM. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* 2009;126:165-76.
28. Kuball J, Hauptrock B, Malina V, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J Exp Med* 2009;206:463-75.
29. Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10985-90.
30. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:336-47.
31. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006;12:1198-202.
32. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006;443:350-4.
33. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 2007;8:1246-54.
34. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11:7-13.
35. Fazekas de St Groth B, Landay AL. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? *AIDS* 2008;22:671-83.
36. Andersson J, Boasso A, Nilsson J, et al. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 2005;174:3143-7.
37. Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, et al. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood* 2006;108:3072-8.
38. Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, et al. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS* 2005;19:879-86.
39. Kinter A, McNally J, Riggan L, Jackson R, Roby G, Fauci AS. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3390-5.
40. Goulder PJ, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol* 2008;8:619-30.
41. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;3:212-7.
42. Feeney ME, Tang Y, Roosevelt KA, et al. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J Virol* 2004;78:8927-30.
43. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 2004;10:282-9.
44. Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, et al. Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2006;80:3617-23.
45. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 2007;13:46-53.
46. Alter G, Rihn S, Walter K, et al. HLA class I subtype-dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2009;83:6798-805.
47. Harari A, Cellera C, Enders FB, et al. Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16233-8.
48. Brockman MA, Brumme ZL, Brumme CJ, et al. Early selection in Gag by protective HLA alleles contributes to reduced HIV-1 replication capacity that may be largely compensated in chronic infection. *J Virol* 2010.
49. Matthews PC, Prendergast A, Leslie A, et al. Central role of reverting mutations in HLA associations with human immunodeficiency virus set point. *J Virol* 2008;82:8548-59.

50. Riviere Y, McChesney MB, Porrot F, et al. Gag-specific cytotoxic responses to HIV type 1 are associated with a decreased risk of progression to AIDS-related complex or AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:903-7.
51. Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, et al. Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J Immunol* 2007;178:2746-54.
52. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996;2:338-42.
53. Streeck H, Frahm N, Walker BD. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat Protoc* 2009;4:461-9.
54. Frahm N, Korber BT, Adams CM, et al. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* 2004;78:2187-200.
55. Shacklett BL. Immune responses to HIV and SIV in mucosal tissues: 'location, location, location'. *Curr Opin HIV AIDS* 2010;5:128-34.
56. Sekaly RP. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 2008;205:7-12.
57. Addo MM, Yu XG, Rathod A, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 2003;77:2081-92.
58. Shacklett BL. Beyond 51Cr release: New methods for assessing HIV-1-specific CD8+ T cell responses in peripheral blood and mucosal tissues. *Clin Exp Immunol* 2002;130:172-82.
59. Jones N, Eggena M, Baker C, et al. Presence of distinct subsets of cytolytic CD8+ T cells in chronic HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:1007-13.
60. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 2008;29:1009-21.
61. Lechner F, Cuero AL, Kantzanou M, Klenerman P. Studies of human antiviral CD8+ lymphocytes using class I peptide tetramers. *Rev Med Virol* 2001;11:11-22.
62. Palmowski M, Salio M, Dunbar RP, Cerundolo V. The use of HLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev* 2002;188:155-63.
63. Yang OO, Kalams SA, Trocha A, et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol* 1997;71:3120-8.
64. Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 1999;397:436-41.
65. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 2006;444:164.
66. Santiago ML, Range F, Keele BF, et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 2005;79:12515-27.
67. Salemi M, Strimmer K, Hall WW, et al. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J* 2001;15:276-8.
68. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998;391:594-7.
69. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009;15:871-2.
70. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;358:1590-602.
71. Takebe Y, Motomura K, Tatsumi M, Lwin HH, Zaw M, Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *AIDS* 2003;17:2077-87.
72. Lau KA, Wang B, Saksena NK. Emerging trends of HIV epidemiology in Asia. *AIDS Rev* 2007;9:218-29.
73. Health VMo. Vietnam HIV/AIDS. Estimates and Projections. 2009.
74. Liao H, Tee KK, Hase S, et al. Phylodynamic analysis of the dissemination of HIV-1 CRF01\_AE in Vietnam. *Virology* 2009;391:51-6.

75. Kato K, Shiino T, Kusagawa S, et al. Genetic similarity of HIV type 1 subtype E in a recent outbreak among injecting drug users in northern Vietnam to strains in Guangxi Province of southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1157-68.
76. Ishizaki A, Cuong NH, Thuc PV, et al. Profile of HIV type 1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naïve HIV type 1-infected individuals in Hai Phong, Viet Nam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:175-82.
77. Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* 1999;283:1748-52.
78. Kawashima Y, Pfafferoth K, Frater J, et al. Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 2009;458:641-5.
79. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 2008;69:443-64.
80. Tishkoff SA, Kidd KK. Implications of biogeography of human populations for 'race' and medicine. *Nat Genet* 2004;36:S21-7.
81. Abdulla MA, Ahmed I, Assawamakin A, et al. Mapping human genetic diversity in Asia. *Science* 2009;326:1541-5.
82. Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, et al. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* 2003;77:4449-56.
83. Huang W, Eshleman SH, Toma J, et al. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J Virol* 2007;81:7885-93.
84. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, et al. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 2004;18:1629-36.
85. John-Stewart GC, Nduati RW, Rousseau CM, et al. Subtype C is associated with increased vaginal shedding of HIV-1. *J Infect Dis* 2005;192:492-6.
86. Hudgens MG, Longini IM, Jr., Vanichseni S, et al. Subtype-specific transmission probabilities for human immunodeficiency virus type 1 among injecting drug users in Bangkok, Thailand. *Am J Epidemiol* 2002;155:159-68.
87. Kanki PJ, Hamel DJ, Sankale JL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* 1999;179:68-73.
88. Alaeus A, Lidman K, Bjorkman A, Giesecke J, Albert J. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* 1999;13:901-7.
89. Kaleebu P, French N, Mahe C, et al. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* 2002;185:1244-50.
90. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* 2007;195:1177-80.
91. Alexander CS, Montessori V, Wynhoven B, et al. Prevalence and response to antiretroviral therapy of non-B subtypes of HIV in antiretroviral-naïve individuals in British Columbia. *Antivir Ther* 2002;7:31-5.
92. Bocket L, Cheret A, Deuffic-Burban S, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness. *Antivir Ther* 2005;10:247-54.
93. Frater AJ, Beardall A, Ariyoshi K, et al. Impact of baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients. *AIDS* 2001;15:1493-502.
94. Pillay D, Walker AS, Gibb DM, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtypes on virologic response and emergence of drug resistance among children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 trial. *J Infect Dis* 2002;186:617-25.
95. Holguin A, Paxinos E, Hertogs K, Womac C, Soriano V. Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. *J Clin Virol* 2004;31:215-20.
96. Grossman Z, Vardinon N, Chemtob D, et al. Genotypic variation of HIV-1 reverse transcriptase and protease: comparative analysis of clade C and clade B. *AIDS* 2001;15:1453-60.
97. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009;4:e4724.
98. Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, et al. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS* 2006;20:F9-13.

99. Brenner B, Turner D, Oliveira M, et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 2003;17:F1-5.
100. Grossman Z, Istomin V, Averbuch D, et al. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *AIDS* 2004;18:909-15.
101. Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, et al. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2159-65.
102. Aidoo M, Sawadogo S, Bile EC, Yang C, Nkengasong JN, McNicholl JM. Viral, HLA and T cell elements in cross-reactive immune responses to HIV-1 subtype A, CRF01\_AE and CRF02\_AG vaccine sequence in Ivorian blood donors. *Vaccine* 2008;26:4830-9.
103. Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005;191:654-65.
104. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* 2006;194:1661-71.
105. BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines--yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis* 2002;2:425-31.
106. Gahery-Segard H, Pialoux G, Figueiredo S, et al. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8+-T-cell epitopes recognized. *J Virol* 2003;77:11220-31.
107. Pialoux G, Quercia RP, Gahery H, et al. Immunological responses and long-term treatment interruption after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) lipopeptide immunization of HIV-1-infected patients: the LIPThera study. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:562-8.
108. Gahery H, Daniel N, Charmeteau B, et al. New CD4+ and CD8+ T cell responses induced in chronically HIV type-1-infected patients after immunizations with an HIV type 1 lipopeptide vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:684-94.
109. Cohen J. AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm? *Science* 2007;318:1048-9.
110. Jaoko W, Karita E, Kayitenkore K, et al. Safety and immunogenicity study of Multiclade HIV-1 adenoviral vector vaccine alone or as boost following a multiclade HIV-1 DNA vaccine in Africa. *PLoS One* 2010;5:e12873.
111. Kibuuka H, Kimutai R, Maboko L, et al. A phase 1/2 study of a multiclade HIV-1 DNA plasmid prime and recombinant adenovirus serotype 5 boost vaccine in HIV-Uninfected East Africans (RV 172). *J Infect Dis* 2010;201:600-7.
112. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009;361:2209-20.
113. Sriwanthana B, Hodge T, Mastro TD, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes, HLA-A11, and chemokine-related factors may act synergistically to determine HIV resistance in CCR5 delta32-negative female sex workers in Chiang Rai, northern Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:719-34.
114. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999;17:739-79.
115. Rock KL, York IA, Goldberg AL. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 2004;5:670-7.
116. Streeck H, Lichterfeld M, Alter G, et al. Recognition of a defined region within p24 gag by CD8+ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals expressing protective HLA class I alleles. *J Virol* 2007;81:7725-31.
117. York IA, Brehm MA, Zendzian S, Towne CF, Rock KL. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9202-7.
118. Deol P, Zaiss DM, Monaco JJ, Sijts AJ. Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J Immunol* 2007;178:7557-62.
119. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 2010;10:73-8.
120. Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 2002;80:1-70.
121. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895-9.

122. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-79.
123. Kloetzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004;5:661-9.
124. Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 1999;274:3363-71.
125. Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 2002;39:147-64.
126. Neisig A, Roelse J, Sijts AJ, et al. Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J Immunol* 1995;154:1273-9.
127. York IA, Chang SC, Saric T, et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 2002;3:1177-84.
128. Craiu A, Akopian T, Goldberg A, Rock KL. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10850-5.
129. Reits E, Neijssen J, Herberts C, et al. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 2004;20:495-506.
130. York IA, Bhutani N, Zendzian S, Goldberg AL, Rock KL. Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 2006;177:1434-43.
131. Seifert U, Maranon C, Shmueli A, et al. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 2003;4:375-9.
132. Saric T, Graef CI, Goldberg AL. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem* 2004;279:46723-32.
133. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002;20:395-425.
134. van Hall T, Sijts A, Camps M, et al. Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* 2000;192:483-94.
135. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* 2001;20:2357-66.
136. Murata S, Uono H, Tanahashi N, et al. Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J* 2001;20:5898-907.
137. Strehl B, Seifert U, Kruger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19-30.
138. Hammer GE, Gonzalez F, James E, Nolla H, Shastri N. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat Immunol* 2007;8:101-8.
139. Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 2000;191:503-14.
140. Ossendorp F, Fu N, Camps M, et al. Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *J Immunol* 2005;174:7815-22.
141. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* 2000;303:643-53.
142. Butz EA, Bevan MJ. Differential presentation of the same MHC class I epitopes by fibroblasts and dendritic cells. *J Immunol* 1998;160:2139-44.
143. Mo AX, van Lelyveld SF, Craiu A, Rock KL. Sequences that flank subdominant and cryptic epitopes influence the proteolytic generation of MHC class I-presented peptides. *J Immunol* 2000;164:4003-10.
144. Shastri N, Serwold T, Gonzalez F. Presentation of endogenous peptide/MHC class I complexes is profoundly influenced by specific C-terminal flanking residues. *J Immunol* 1995;155:4339-46.

145. Theobald M, Ruppert T, Kuckelkorn U, et al. The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope. *J Exp Med* 1998;188:1017-28.
146. Milicic A, Price DA, Zimbwa P, et al. CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. *J Immunol* 2005;175:4618-26.
147. Chen W, Anton LC, Bennink JR, Yewdell JW. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 2000;12:83-93.
148. Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, et al. Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 2003;18:97-108.
149. Herberts CA, Neijssen JJ, de Haan J, et al. Cutting edge: HLA-B27 acquires many N-terminal dibasic peptides: coupling cytosolic peptide stability to antigen presentation. *J Immunol* 2006;176:2697-701.
150. Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res* 2008;6:388-400.
151. Peters B, Bulik S, Tampe R, Van Endert PM, Holzhutter HG. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J Immunol* 2003;171:1741-9.
152. Tenzer S, Peters B, Bulik S, et al. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1025-37.
153. Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the Lasso. *Journal of the Statistical Society* 1996;268-88.
154. Lev A, Takeda K, Zanker D, et al. The exception that reinforces the rule: crosspriming by cytosolic peptides that escape degradation. *Immunity* 2008;28:787-98.
155. Gullo CA, Teoh G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunol Lett* 2004;94:1-10.

# ANNEXES

## **Annexe 1 : PUBLICATION N°1**

*Sequences of clustered epitopes in Gag and Nef potentially presented by predominant class I human leukocyte antigen (HLA) alleles A and B expressed by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients in Vietnam.*

Estibaliz Lazaro, Ioannis Theodorou, Elisabeth Legrand, Patricia Recordon-Pinson, Sebastien Boucher, Corinne Capoulade, Thi Hoang Lan, Pham Van Hung, Patrice Debre, Herve Fleury  
AIDS Research and Human Retroviruses 2005 ; 21 :586-91

## **Annexe 2 : PUBLICATION N°2**

*Molecular characterization of HIV-1 CRF01\_AE in Mekong delta, Vietnam, and impact of T-cell epitope mutations on HLA recognition (ANRS 12159).*

Estibaliz Lazaro\*, Luong Thu Tram\*, Pantxika Bellecave, Gwenda-Line Guidicelli, Guerric Anies, Huynh Hoang Khanh Thu, Marie Pillot Debelleix, Muriel Vray, Patricia Recordon-Pinson, Jean-Luc Taupin, Truong Thi Xuan Lien, Herve Fleury<sup>1</sup>  
Plos One, submitted

## **Annexe 3 : PUBLICATION N°3**

*Differential HIV epitope processing in Monocytes and CD4T cells affects Cytotoxic Lymphocyte Recognition.*

Estibaliz Lazaro, Sasha Blue Godfrey, Pamela Stamegna, Tobi Ogbichie, Christopher Kerrigan, Mei Zhang, Bruce D. Walker, Sylvie Le Gall.  
The Journal of Infectious Diseases 2009 ;200 :236-43

## **IMPACT DU SOUS-TYPE VIRAL ET DE L'APPRÊTEMENT ANTIGENIQUE SUR LA PRESENTATION DES EPITOPES DU VIH-1 PAR LES MOLECULES HLA DE CLASSE I**

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) dirigés contre le VIH jouent un rôle essentiel dans la défense anti-virale. L'identification des facteurs impliqués dans la variabilité de ces réponses est indispensable à la mise au point de vaccins efficaces.

Nous avons focalisé notre travail sur deux facteurs potentiellement impliqués dans la reconnaissance du virus par le HLA : le sous-type viral et la qualité de l'apprêtement antigénique.

L'extrême variabilité du virus avec à ce jour 11 sous-types et 48 formes recombinantes (CRFs) circulant au sein de populations au typage HLA hétérogène implique un polymorphisme important avec des mutations d'échappement multiples.

Nos résultats montrent que dans la population Vietnamiennne infectée par le VIH, le CRF01\_AE prédomine largement et que l'affinité pour la molécule HLA des épitopes CTL classiquement décrits dans les sous-types B est drastiquement diminuée, ce qui favorise l'échappement de ce sous-type viral au système immunitaire.

Par ailleurs, nous avons montré que l'apprêtement des épitopes CTL dépend du type de cellule impliquée, les monocytes se caractérisant par une capacité de présentation significativement plus forte à l'origine d'une réponse CTL plus efficace comparativement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Des tests de dégradation *in vitro* ont démontré que la stabilité intracellulaire des épitopes est hautement variable, dépendante de la séquence en acides aminés et contribue à l'optimisation de la réponse CTL.

L'ensemble de ces résultats indiquent que, au delà de l'affinité pour le HLA ou le TCR et des facteurs d'épuisement cellulaire, la réponse CTL peut aussi être modulée par le sous-type viral et l'apprêtement antigénique.

**Mots Clés :** HIV-1, polymorphisme viral, apprêtement antigénique, CTL, HLA de classe I

## **IMPACT OF HIV-1 SUB-TYPE AND ANTIGEN PROCESSING ON HLA CLASS I RECOGNITION**

HIV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) play a critical role for clearance of virus-infected cells and induction of these cells is a necessary component of any successful vaccine strategy against AIDS. Therefore, identification of the factors defining and modulating the efficiency of these protective responses are urgently needed.

We focused our study on two factors potentially involved in HLA recognition: HIV-1 sub-type and antigen processing.

The extreme variability of the virus with to date 11 HIV-1 subtypes and 48 circulating recombinant forms (CRFs) circulating worldwide among heterogeneous populations imply high polymorphism and different mutational escape patterns.

We demonstrate that among the HIV-1 infected Vietnamese population where the CRF01\_AE is largely predominant, the HLA binding of known CTL epitopes is strongly reduced compared to the subtype B due to intraepitopic mutations, facilitating immune evasion of these viral strains.

Moreover, we show that the presentation of adequate amounts of epitopes leading to CTL recognition depends on the subset cells involved in the antigen processing, monocytes having a significantly higher and more efficient proteolytic activity. Using *in vitro* degradation assays, we measured the intracellular HIV-1 epitope stability and demonstrated that this factor is highly variable, sequence dependent and also contributes to a more efficient presentation.

Together, these data indicate that, besides HLA and TCR binding and exhaustion factors, HIV-1 CTL recognition can also be modulated by the viral sub-type and the antigen processing machinery.

**Key Words :** HIV-1, viral polymorphism, antigen processing, CTL, HLA class I

### **Laboratoires d'accueil :**

Laboratoire de virologie (EA 2968), Université Victor Segalen Bordeaux 2, France

Ragon Institute du Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston (USA)

## Sequence Note

# Sequences of Clustered Epitopes in Gag and Nef Potentially Presented by Predominant Class I Human Leukocyte Antigen (HLA) Alleles A and B Expressed by Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Patients in Vietnam

ESTIBALIZ LAZARO,<sup>1</sup> IOANNIS THEODOROU,<sup>2</sup> ELISABETH LEGRAND,<sup>1</sup>  
PATRICIA RECORDON-PINSON,<sup>1</sup> SEBASTIEN BOUCHER,<sup>1</sup> CORINNE CAPOULADE,<sup>2</sup>  
THI HOANG LAN,<sup>3</sup> PHAM VAN HUNG,<sup>3</sup> PATRICE DEBRE,<sup>2</sup> and HERVE FLEURY<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The aim of this study was to define pluriepitopic regions in Gag and Nef possibly relevant in the perspective of a vaccine design in a vietnamese population. The protein sequences derived from *gag* and *nef* genes and phenotyping of the class I human leukocyte antigens (HLA) A and B alleles were established for 28 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients from Ho Chi Minh City, Vietnam. The protein sequences display polymorphism mutations as compared with a B reference strain (HXB2). The most frequently represented HLA-A and -B alleles were HLA-A11, A02, and A33 expressed by 35.7, 23.2, and 21.4% of the patients, respectively, and HLA-B75, B46, and B62 expressed by 35.7, 25, and 17.9% of the patients, respectively. This study allows us to determine four pluriepitopic regions in Gag and Nef that should be chosen for a vaccine design in a Vietnamese population.

**M**ORE THAN 60 MILLION INDIVIDUALS WORLDWIDE have been infected with HIV-1 of whom 20 millions have died since the beginning of the epidemic. HIV-1 is rapidly spreading in Asian countries. In Vietnam, the first case of HIV-1 infection was identified in Ho Chi Minh City (HCMC) in 1990. There was then a rapid spread of infection among intravenous drug users and female sex workers mostly in the southern part of the country and particularly in HCMC.<sup>1</sup> The number of infected patients is expanding rapidly and the progression from positive serology to AIDS seems faster than in other countries. The estimated number of potentially infected individuals may rise to more than 200,000 by the end of 2005 in Vietnam.<sup>2</sup> Previous studies, including one from our group involving 200 isolates,

have shown that the circulating recombinant form AE (CRF01\_AE) was very predominant in Vietnam, especially in HCMC.<sup>3</sup> The need to develop a vaccine to either protect people from infection or attenuate the course of the disease has become increasingly important. This aim should take into account the diversity of the HIV-1 genome and the genetic background of the population. The specific CD8 cytotoxic T-lymphocyte response plays a critical role in the control of viral replication. Induction and maintenance of this response are of primary importance in the development of an effective vaccine. Initially, most of the studies focused on HIV-1-infected white individuals. However, data concerning African and Asian populations are now available.<sup>4,5</sup> In two recent and comprehensive studies,

<sup>1</sup>Laboratoire de Virologie (EA 2968), Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Bordeaux, France.

<sup>2</sup>INSERM U 543, Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, 75012 Paris, France.

<sup>3</sup>Direction of Health Service, Ho Chi Minh City, Vietnam.

TABLE 1. PRIMERS USED FOR AMPLIFICATION OF *gag* AND *nef* GENE

| Region       | First PCR                                                             | Region        | Nested PCR                                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------|
| <i>Nef</i>   | 5' AG CGG GGT GGA CAG ATA GGG 3'<br>(bases 8690–8709)                 | <i>Nef</i>    | 5' ATA CCT AGA AGA ATC AGA CAG GGC TT 3'<br>(bases 8751–8777)        |
|              | 5' CCC TGG AAA GTC CCC AGC GGA AGT<br>3' (bases 9438–9461)            |               | 5' CAG TCT TTG TAG TAC TCT GG 3'<br>(bases 9394–9410)                |
| <i>Gag 1</i> | 5' GAC TAG CGG AGG CTA GAA 3'<br>(bases 764–784)                      | <i>Gag 1a</i> | 5' GAC TAG CGG AGG CTA GAA G 3'<br>(bases 764–784)                   |
|              | 5' TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA 3'<br>(bases 1631–1658)            |               | 5' GTT CTA GGT GAT ATG GCC CTG ATG 3'<br>(bases 1219–1242)           |
|              |                                                                       | <i>Gag 1b</i> | 5' CAC CTA GAA CTT TAA ATG CAT G GG T 3'<br>(bases 1232–1256)        |
|              |                                                                       |               | 5' TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA 3'<br>(bases 1631–1658)           |
| <i>Gag 2</i> | 5' ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG GAG<br>AAA TT 3' (bases 1544–1573)     | <i>Gag 2a</i> | 5' ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG G AG AAA<br>TT 3' (bases 1544–1572)   |
|              | 5' AAT G CT TTT A TT TTT TCT TCT G TC<br>AAT GGC 3' (bases 2621–2650) |               | 5' AGG GGT CGT TGC CAA AGA 3'<br>(bases 1544–1573)                   |
|              |                                                                       | <i>Gag 2b</i> | 5' TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC<br>A 3' (bases 2135–2163)     |
|              |                                                                       |               | 5' AAT GCT TTT A TT TTT TCT TCT G TC AAT<br>GGC 3' (bases 2621–2650) |

the cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses obtained from more than 500 nonwhite patients living in the United States were tested against a panel of peptides encompassing the total genome of a B isolate.<sup>6,7</sup> Multiepitopic, immunodominant, and conserved regions in Gag and Nef proteins were recognized independently of the host genetic background and could be considered as potential vaccine candidates.<sup>8</sup> Another report from Inwoley *et al.*<sup>9</sup> confirmed the class-clade conservation of the Nef immunodominant region in CRF02\_AG isolates from Ivory Coast patients.

The aim of the present study was to compare the degree of polymorphism of the Gag and Nef proteins in 28 untreated individuals from the cohort previously investigated in HCMC with that of a B reference strain (HXB2).<sup>3</sup> In parallel, identification of the HLA major histocompatibility complex class I alleles was performed in the same individuals.

The 28 patients were recruited from the Center for Preventive Medicine of HCMC. They were either drug users or sexually transmitted disease patients. Their median viral load was 5.2 log (range 3.6–6.5). DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of the patient using the High Pure Viral DNA kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and amplified using sets of specific primers (Table 1). Fragments obtained were sequenced on both strands using the CEQ 2000 DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter). The derived amino acid sequences of Gag and Nef were aligned with the HXB2 reference strain to visualize the epitope regions using Clustal W (1.74) multiple sequence alignment software.

HLA class I typing was performed from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). DNA previously extracted was amplified using the Inno-Lipa HLA A and B multiplex kits (Abbott Laboratories) according to the sequence-specific oligonucleotide (SSO) technique.

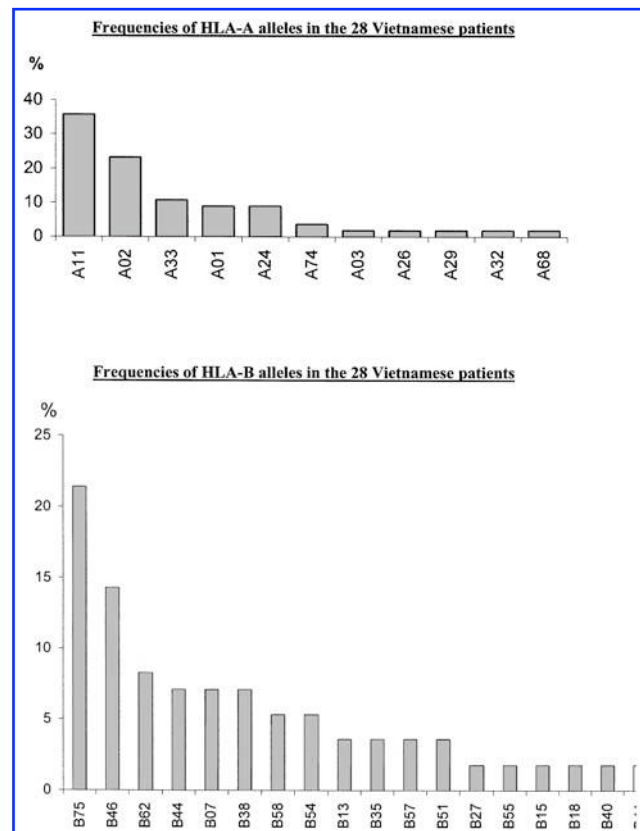


FIG. 1. Frequency of the HLA class I alleles expressed in the studied Vietnam patients. The HLA class I A and B alleles are represented on the x axis and the corresponding frequencies of each allele are represented on the y axis.

The HLA class I alleles could be determined in 25 of 28 patients (Fig. 1). The distribution of the HLA-A class exhibits a predominance of HLA-A11, A02, and A33 alleles present in 35.7, 23.2, and 21.4% of the population, respectively. The HLA-B15 superfamily is widely represented, the frequencies of HLA-B75 and B62 being 35.7% and 17.9%, respectively. This distribution differs from that observed in white individuals in whom the frequency of the HLA-B75 allele is low, and is very similar to that recently described in Chinese populations.<sup>5</sup> However, the high frequency of the HLA-B40 allele (30%) in China is not encountered in Vietnam (3.5%). Some rare alleles have been associated with an effective or poor control of HIV infection. HLA-B57 and B58 are associated with a good prognosis: this is based on the reversion of an escape mutation (substitution of Thr with Asn at residue 242) in the Gag epitope 240–249 upon transmission of the mutated isolate to newly infected B57- or B58-negative recipients.<sup>10</sup> The frequency of such phenotypes is low in our cohort; however, we have found the same results, since in all five of the patients expressing this HLA phenotype the mutation T242N is present (Fig. 2).

Gag sequences were obtained from 28 isolates (Fig. 2). The degree of homology was evaluated by taking into account the sequences corresponding to the pluriepitopic regions. As compared with the HXB2 strain, the Gag sequence displays a high degree of homology (94.4%), which reaches 100% in the patient sequences. We determined pluriepitopic regions in Gag and Nef in agreement with a recent report concerning healthy white volunteers immunized with lipopeptides used in a phase I trial to determine clinical tolerance and immune efficiency in the setting of the B subtype.<sup>8</sup> Epitopes in these regions have also been considered as components of potential candidate vaccines in the study reported by Frahm *et al.*<sup>7</sup> Retained epitopes can be found in the NIH molecular database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>) and reported in a recent publication.<sup>11</sup> They have been taken into account when the presenting HLA molecule was expressed in at least 14% of the Vietnam patients included in the cohort. To assess the impact of mutations observed in CRF01\_AE isolates as compared with HXB2, a computer scoring was used.<sup>12</sup> It allows us to evaluate the ability of an epitope to bind the HLA allele known as the presenting class I molecule. For a given peptide, the best

|      |               | GAG 275-283 (A2)                                |                  |                |
|------|---------------|-------------------------------------------------|------------------|----------------|
|      |               | GAG 269-277 (B62)                               |                  |                |
|      |               | GAG 267-274 (A2, A3)                            |                  |                |
|      |               | GAG 261-270 (A24)                               |                  |                |
|      |               | GAG 240-249 (B57)                               | GAG 260-268 (A2) |                |
| HXB2 |               | TSTLQEQIQWM-TNNPP-IPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD |                  | HLA A HLA B    |
| 1    | *****         | D*****G**R*                                     |                  | 11/24 7/75     |
| 3    | ****LQDT***** |                                                 |                  | 2/11 62/75     |
| 4    | *****         | D*****LGL*****V****                             |                  | 2/33 44/75     |
| 6    | *****         | D*****V****                                     |                  | 2/11 75/75or62 |
| 13   | *****         | D*****V**IG                                     |                  | 2/29 7/46      |
| 14   | *****         | AP*****D*****K-----                             |                  | 11/24 35/62    |
| 15   | *****         | A*****V****                                     |                  | 2/11 44/46     |
| 16   | *****         | D*****V****                                     |                  | 11/11 38/46    |
| 17   | *****         | S*****D*****V****                               |                  | 11/32 38/51    |
| 18   | **N*****      | D*****V****                                     |                  | 1/2 46/57      |
| 19   | *****         | D*****V****                                     |                  | 11/11 55/75    |
| 20   | **N*****      | D*****V****                                     |                  | 2/33 58/62     |
| 21   | **N*****      | D*****V**W*                                     |                  | 11/33 54/58    |
| 22   | *****         | S*****D*****V**W*                               |                  | 11/24 75/75    |
| 23   | *****         | D*****V****                                     |                  | 2/3 35/46      |
| 24   | *****         | D*****RV****                                    |                  | 1/74 51/54     |
| 25   | **N*****      | D*****V****                                     |                  | 2/11 46/58     |
| 26   | *****         | D*****V****                                     |                  | 2/24 27/54     |
| 27   | *****         | D*****A-----                                    |                  | 2/24 13/75     |
| 28   | *****         | D*****V****                                     |                  | 2/33 18/44     |
| 29   | *****         | D*****V****                                     |                  | 1/11 7/40      |
| 30   | *****         | D*****V****                                     |                  | 11/11 38/75    |
| 31   | *****         | D*****V****                                     |                  | 2/11 46/62or75 |
| 33   | **N*****      | D*****VG**                                      |                  | 1/11 15/57     |
| 34   | *****         | D*****T*****G**N                                |                  | 11/33 7/44     |
| 35   | *****         | D*****V****                                     |                  | 1/26 38/75     |
| 36   | *****         | HP*****D*****V****                              |                  | 68/74 13/56    |
| 38   | *****         | D*****V****                                     |                  | 1/33 46/41or42 |

Pluriepitopic Gag 240-284 region

\* amino acid similar to the HXB2 reference strain  
- undefined amino acid

**FIG. 2.** Alignment of the *gag* pluriepitopic region of CRF01\_AE sequences from the 28 patients compared with the B subtype reference HXB2 sequence. Asterisks denote sequence identity with the HXB2 sequence. Underlined CD8 cytotoxic T cell epitopes are those presented by the most frequently represented HLA alleles in the patients. They are defined by the residue positions in the Gag sequence. The HLA A and B alleles corresponding to each patient are reported in the two columns at the right of the table.

score is obtained when it contains the correct dominant and auxiliary residues ([http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)). When data were not available from the BIMAS site, another algorithm from <http://www.syfpeithi.de/> was used.<sup>13</sup> Values of Bimas binding scores reported in Table 2 are either those that were superior or equal to 8 or those for which scores differed between HXB2 and CRF01\_AE epitopes. No threshold value is defined for scores obtained from the other algorithm SYFPEITHI, the score of which varies from 0 to 30. The epitope sequences in HXB2 and CRF01\_AE and the corresponding binding score to HLA alleles are reported in Table 2.

In the multiepitopic Gag 253–284 region, three epitopes presented by HLA-A2/A3, B62, and A2 are relevant in a vaccine perspective. The Gag 267–274 sequence is identical in both strains. In the epitope Gag 275–283, the mutation T280V concerning most of the patients (19/28) results in an increased binding score. However when the L283W mutation (2/28 patients) affects the anchor position, the peptide is no longer presented.

Nef sequences were obtained from 23 isolates (Fig. 3) and were more variable than Gag sequences: 75% as compared with

HXB2 and 96.2% among all CRF01\_AE isolates. Most mutations are conservative and since they are shared by most isolates are polymorphism variations: A83G, V85F, E98D, Y120F, V133I, T138C, Y142F, R184K, H192R, V194I, H199R, and F203Y. Four induce dramatic changes: H89F, E180M, R188A, and F191R.

Three epitopes in the Nef 68–100 region are presented by HLA A2, B62, and A3/A11. All mutations are conservative. In the epitope 83–91, three mutations, A83G, V85F, and H89F (20/23 patients), result in enhancing the binding score from 6.7 to 143. One, H89F (20/23 patients), in the 93–90 epitope does not change the binding score.

The Nef 116–145 region encompasses nine epitopes, three of which presented by HLA-A1, A24, and A2 have been selected (Table 2). Conservative or nonconservative substitutions in positions not involved in the anchoring of the epitope do not significantly affect the binding.

In the Nef 180–204 region, three of five epitopes that bind to HLA A2, A1, and A24 have been selected (Table 2). Epitope 180–189 binds to A2 in the CRF01\_AE isolates (18/23 pa-

TABLE 2. BINDING SCORES OF THE GAG AND NEF EPITOPES IN CRF 01\_AE AND HXB2 REFERENCE STRAINS RECOGNIZED BY THE MOST FREQUENTLY IDENTIFIED HLA CLASS I ALLELES IN THE VIETNAM PATIENTS

| Epitope <sup>a</sup>             | HLA    | HXB2                    |                            | CRF 01_AE                           |               |
|----------------------------------|--------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------------|---------------|
|                                  |        | Sequence                | Binding score <sup>b</sup> | Sequence <sup>a</sup>               | Binding score |
| Pluriepitopic Gag 253–284 region |        |                         |                            |                                     |               |
| Gag 267–274                      | A2     | ILGLNKIV                | 24                         | ILGLNKIV                            | 24            |
|                                  | A3     |                         | 8                          |                                     | 8             |
| Gag 269–277                      | B62    | GLNKVRMY                | 80                         | GLNKVRMY                            | 80            |
| <b>Gag 275–283</b>               | A2     | RMYSPTSIL               | 20                         | RMYSPPVSIL (19/28) <sup>c</sup>     | 46            |
|                                  |        |                         |                            | RMYSPPVSIW (2/28)                   | 0             |
| Pluriepitopic Nef 68–100 region  |        |                         |                            |                                     |               |
| <b>Nef 83–91</b>                 | A2     | AAVDLSHFL               | 6.7                        | <b>GAFDLSFFL</b> (20/23)            | 143           |
| <b>Nef 83–90</b>                 | B62    | AAVDLSHF                | 6.7                        | <b>GAFDLSFF</b> (20/23)             | 143           |
| Nef 86–94                        | A3/A11 | DLSHFLKEK               | 13.5                       | DLSFFLKEK (22/23)                   | 13.5          |
| Pluriepitopic Nef 116–145 region |        |                         |                            |                                     |               |
|                                  |        |                         |                            | FPDWQNYT                            | 14            |
| Nef 121–128                      | A1     | FPDWQNYT                | 14                         | FPDW <del>H</del> NYT(12/23)        | 12            |
| Nef 134–143                      | A24    | RYPLTFGWCY              | 18                         | RYPLCFGWCY (23/23)                  | 18            |
| <b>Nef 136–145</b>               | A2     | PLTFGWCKYL              | 7                          | PLCFGWCFKL (23/23)                  | 8             |
| Pluriepitopic Nef 180–204 region |        |                         |                            |                                     |               |
| <b>Nef 180–189</b>               | A2     | VLEWRFD <del>S</del> RL | 0                          | <b>LMWKFD<del>S</del>AL</b> (18/23) | 29            |
| Nef 184–191                      | A1     | RFDSRLAF                | 10                         | <b>KFD<del>S</del>ALAR</b> (17/23)  | 10            |
|                                  |        |                         |                            | <b>ARRHIAREL</b> (6/23)             | 0.6           |
| Nef 190–198                      | A24    | AFHHVAREL               | 30.8                       | <b>ARTHIAREL</b> (5/23)             | 0.6           |
|                                  |        |                         |                            | <b>ARKHIAREL</b> (3/23)             | 0.6           |

<sup>a</sup>Mutations in CRF01\_AE epitopes and epitopes with increased binding score in CRF01\_AE strains are in bold characters.

<sup>b</sup>Binding scores according to the NIH site [http://bimas.dcrtnih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrtnih.gov/molbio/hla_bind/). Only values the score of which was equal or superior to 8 have been reported. Otherwise reported values are those for which scores were modified in CRF01\_AE. Binding scores according to the <http://www.syfpeithi.de/> site (values in italics) vary from 30 to 0 without a specified threshold.

<sup>c</sup>Number of patients whose sequence expresses the mutation.

|                                 |                                          |                                       | NEF 137-145 (A2)                 | NEF 136-145 (A2)    | NEF 136-144 (A3, A11) | NEF 134-143 (A24)                | NEF 134-141 (A33) | NEF 195-203 (A1) | NEF 190-198 (A2, A24) | NEF 188-196 (A3, A11) | NEF 184-191 (A1) | NEF 180-189 (A2) | HLA A | HLA B     |
|---------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------------|-------|-----------|
|                                 |                                          |                                       | NEF 86-94 (A3, A11)              | NEF 84-90 (A2, B62) | NEF 83-90 (B62)       | NEF 83-91 (A2)                   | NEF 126-133 (A24) | NEF 121-128 (A1) | NEF 120-128 (A1)      | NEF 117-127 (B62)     | NEF 73-82 (A3)   | NEF 73-82 (A3)   |       |           |
| HXB2                            | FPVTPQVP-LRPMYTKAAVDLSHFLKEKGG-LEGL..... | HTQGYFPDQNTPTGPGVR-YPLTFG-WCY-KL..... | VLEWRFDSR-LAFHHVARELHPEYFK       |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  |       |           |
| 3                               | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/11  | 62/75     |
| 4                               | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/33  | 44/75     |
| 13                              | ***K***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/29  | 7/46      |
| 14                              | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/24 | 35/62     |
| 15                              | ***RL***-*****G*F***F*****-D**.....      | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/11  | 44/46     |
| 16                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-GT*B.....    | ***S***Y*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/11 | 38/46     |
| 17                              | ***RR***-*****G*F***F*****-D**.....      | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/32 | 38/51     |
| 18                              | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 1/2   | 46/57     |
| 20                              | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/33  | 58/62     |
| 21                              | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/33 | 54/58     |
| 22                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-E***.....    | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/24 | 75/75     |
| 24                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***S*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 1/74  | 51/54     |
| 25                              | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/11  | 46/58     |
| 26                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/24  | 27/54     |
| 27                              | ***S***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/24  | 13/75     |
| 28                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 2/33  | 18/44     |
| 29                              | ***R***-*****G*F***F*****-D**.....       | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 1/11  | 7/40      |
| 30                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/11 | 38/75     |
| 33                              | YARR**--GTGKK*SGVL*EQR*EV*QYL*G***.....  | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 1/11  | 15/57     |
| 34                              | ***S***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 11/33 | 7/44      |
| 35                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 1/26  | 38/75     |
| 36                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 68/74 | 13/56     |
| 38                              | ***R***-*****P*G*F***F*****-D**.....     | ***F***H*****I***-C***-F***.....      | **M*K***A*-*****-*****           |                     |                       |                                  |                   |                  |                       |                       |                  |                  | 1/33  | 46/41or42 |
| Pluriepitopic Nef 68-100 region |                                          |                                       | Pluriepitopic Nef 116-145 region |                     |                       | Pluriepitopic Nef 180-204 region |                   |                  |                       |                       |                  |                  |       |           |

\* amino acid similar to the HXB2 reference strain  
- undefined amino acid

**FIG. 3.** Alignment of the *nef* pluriepitopic regions of CRF01\_AE sequences from the 28 patients compared with the B subtype reference HXB2 sequence. Asterisks denote sequence identity with the HXB2 sequence. Underlined CD8 cytotoxic T cell epitopes are those presented by the most frequently represented HLA alleles in the patients. They are defined by the residue positions in the Nef sequence. The HLA A and B alleles corresponding to each patient are reported in the two columns at the right of the figure.

tients) whereas it is not represented in the HXB2 strain. In contrast, epitope 190–198, which binds to A24 in the B subtype, is mutated (less than 25% of patients) in the CRF01\_AE isolates (F191R, H192R/T/K, and V194I) and is weakly or not represented.

Overall, 14 mutations were identified in Gag and Nef regions encompassing selected epitopes: seven did not affect the HLA binding score and three increased it in epitopes Gag 275–283, Nef 83–91, and Nef 136–145, all of which were not situated in anchor positions. All the four other ones that were situated at anchor residues decreased or abrogated the binding score (Nef 180–189 and Nef 190–198).

The HLA binding is the first step of the cytotoxic reaction mediated by CD8 CTL. According to the nonconservative or conservative type of mutations concerning residues at anchor positions, the HLA binding and presentation to the T cell receptor may be abrogated or maintained. As observed in our patients, the impact of mutations at other intraepitopic positions does not decrease the binding score. Such mutations induced by nucleoside reverse transcriptase (RT) inhibitors in RT epitopes do not modify or even increase the immunogenicity of the epitopes and the CTL responses.<sup>14</sup> The phenomenon of CTL escape mutations in HIV infection has been well documented. Immune pressure results in escape mutations that abrogate, decrease, or maintain the recognition of epitopes by the specific CTL clones.<sup>15–17</sup> Clonal CTL exhaustion may impair the ability of the immune system to adapt the CTL responses to mutations and maintain recognition. This depends on the disease stage and on the status of the T cell repertoire, which is pro-

gressively deleted during progression to AIDS.<sup>18</sup> Confrontation of data in the perspective of a vaccinal design should allow us to determine whether epitopes or pluriepitopic regions from B subtypes remain relevant in the perspective of future investigations using ELISPOT tests to evaluate the immune responsiveness of CRF01\_AE-infected populations.

Unexpectedly, except for the Gag T242N escape mutation associated with HLA B57–B58, we did not observe punctual mutations in epitopes recognized by the more frequently observed HLA alleles. In particular, the H versus Q mutation at position Nef 225 is not correlated with any particular HLA allele (data not shown). Notably, no mutation could be significantly associated with the phenotype HLA-B75 frequently present in the Vietnamese population, providing any information about the recognized epitope(s), but more subjects should be investigated to allow clear conclusions concerning escape mutations. However, according to these results, we do not argue for a role of HLA-restricted immune responses in driving HIV-1 evolution as suggested by Moore *et al.*<sup>19</sup>

Some recently infected patients may not have yet developed escape mutations. In other cases, the cost of mutation(s) to viral fitness and replication may favor the persistence of a wild-type variant displaying a selective advantage over a mutant isolate.<sup>20</sup> CTL escape variants can also revert to wild-type sequences after infecting new hosts possessing disparate HLA class I alleles.<sup>10</sup> Such a reversion has been described in the Gag 240–249 epitope at mutation T242N. Epitopes concerned with reversion of the escape mutation may be extremely relevant in a CTL-based vaccine design. These observations emphasize the

necessity to identify precisely the CTL responses against B and possibly CRF01\_AE isolates before considering a valuable vaccine project.

The polymorphism conservative mutation mode in most of the cases do not concern anchor residues; this is consistent with persistent HLA binding. A previous paper demonstrated good agreement between the HLA binding of drug-mutated RT epitopes and their ability to be recognized by CD8 T cells in an *in vitro* ELISPOT assay.<sup>14</sup> Moreover, some of the mutations increased rather than impaired the immunogenicity of the corresponding CTL epitopes. In this study we identified four pluri-epitopic regions (Gag 253–284, Nef 68–100, Nef 116–145, and Nef 180–204) presented by the most frequently identified HLA class I alleles in the Vietnamese population that should be tested in an ELISPOT assay in the perspective of a vaccine design in Asia.

## REFERENCES

- Tran TT, Maljkovic I, Swartling S, Phung DC, Chiodi F, and Leitner T: HIV-1 CRF01\_AE in intravenous drug users in Hanoi, Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20(3):341–345.
- ONUSIDA/OMS: AIDS epidemic update: December 2003.
- Lan NT, Recordon-Pinson P, Hung PV, *et al.*: HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large predominance of CRF01\_AE and presence of major resistance mutations to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19(10):925–928.
- Novitsky V, Cao H, Rybak N, *et al.*: Magnitude and frequency of cytotoxic T-lymphocyte responses: Identification of immunodominant regions of human immunodeficiency virus type 1 subtype C. *J Virol* 2002;76(20):10155–10168.
- Yu XG, Addo MM, Perkins BA, *et al.*: Differences in the expressed HLA class I alleles effect the differential clustering of HIV type 1-specific T cell responses in infected Chinese and caucasians. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20(5):557–564.
- Bansal A, Sabbaj S, Edwards BH, *et al.*: T cell responses in HIV type 1-infected adolescent minorities share similar epitope specificities with whites despite significant differences in HLA class I alleles. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19(11):1017–1026.
- Frahm N, Korber BT, Adams CM, *et al.*: Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* 2004;78(5):2187–2200.
- Gahery-Segard H, Pialoux G, Figueiredo S, *et al.*: Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: Characterization of CD8+-T-cell epitopes recognized. *J Virol* 2003;77(20):11220–11231.
- Inwoley A, Recordon P, Minga A, *et al.*: Cross-reactive HIV-1 clade B CD8 T-lymphocytes in patients infected with HIV-1 subtype A/G(CRFO2) living in Ivory Coast (West Africa). 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 10–14, 2003, Boston, MA. Abstract 324.
- Leslie AJ, Pfafferoth KJ, Chetty P, *et al.*: HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 2004;10(3):282–289.
- Choppin J, Cohen W, Bianco A, *et al.*: Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: Wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation. *J Immunol* 2001;166(10):6164–6169.
- Parker KC, Bednarek MA, and Coligan JE: Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 1994;152:163–175.
- Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, Jung G, and Rammensee HG: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290–296.
- Samri A, Haas G, Duntze J, *et al.*: Immunogenicity of mutations induced by nucleoside reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 2000;74(19):9306–9312.
- Borrow P, Lewicki H, Wei X, *et al.*: Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997;3(2):205–211.
- Goulder PJ, Brander C, Tang Y, *et al.*: Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 2001;412(6844):334–338.
- Yang OO, Sarkis PT, Ali A, *et al.*: Determinant of HIV-1 mutational escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2003;197(10):1365–1375.
- Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, *et al.*: Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* 1998;4(2):215–221.
- Moore CB, John M, James IR, *et al.*: Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 2002;296:1439–1443.
- Friedrich TC, Dodds EJ, Yant LJ, *et al.*: Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nat Med* 2004;10(3):275–281.

Address reprint requests to:

Elisabeth Legrand  
Universite Victor Segalen-Bordeaux 2  
Laboratoire de Virologie (EA 2968)  
146 rue Leo Saignat  
Bordeaux, France

E-mail: elisabeth.legrand@viro.u\_bordeaux2.fr

Molecular characterization of HIV-1 CRF01\_AE in Mekong delta,  
Vietnam, and impact of T-cell epitope mutations on HLA recognition  
(ANRS 12159)

Estibaliz Lazaro<sup>1\*</sup>, Luong Thu Tram<sup>2\*</sup>, Pantxika Bellecave<sup>1</sup>, Gwenda-Line Guidicelli<sup>3</sup>,  
Guerric Anies<sup>3</sup>, Huynh Hoang Khanh Thu<sup>2</sup>, Marie Pillot Debelleix<sup>1</sup>, Muriel Vray<sup>4</sup>,  
Patricia Recordon-Pinson<sup>1</sup>, Jean-Luc Taupin<sup>3</sup>, Truong Thi Xuan Lien<sup>2</sup>, Herve Fleury<sup>1</sup>

1. Laboratoire de Virologie (EA 2968), Université Victor Segalen-Bordeaux 2, Bordeaux, France
2. Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam
3. CNRS-UMR 5164, 146 rue Léo Saignat, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, France
4. Institut Pasteur, Paris, France

\* these authors contributed equally

## Background

To date 11 HIV-1 subtypes and 48 circulating recombinant forms (CRFs) have been described worldwide. The underlying reason why the dynamics and the distribution of the different HIV-1 subtypes into the Caucasian, African and Asian populations is so heterogeneous and unbalanced is not clear. In Southeastern Asia HIV-1 is expanding rapidly and CRF01\_AE is responsible for 84% of all infections. This predominance may be determined by host genetic factors that could modulate this specific distribution. The aim of this study was to describe HIV-1 strains circulating in a non explored area of Mekong delta, Vietnam, and to assess the impact of amino acids mutations within optimal epitopes on antigen processing and HLA binding.

## Methods

We recruited 125 chronically antiretroviral naive HIV-1-infected people from five cities of the Mekong delta. We performed high-resolution DNA typing of HLA class I alleles, sequencing of Gag and RT-Prot genes and phylogenetic analysis of the strains. We analysed epitope mutations in patients bearing the HLA allele restricting the studied epitope. Optimal wild-type epitopes from the Los Alamos database were used as the reference. T cell epitope recognition was predicted using the immune

epitope database tool ([www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org)) according to three different scores involved in antigen processing (TAP and proteasome scores) and HLA binding (MHC score). Paired t-tests were used for comparisons.

## **Results**

All sequences clustered with CRF01\_AE. HLA class I genotyping showed the predominance of Asian alleles as A\*1101 and B\*4601 with a Vietnamese specificity held by the haplotypes A\*2901-B\*0705-Cw\*1505/Cw\*1504.

The percentage of homology between Mekong and B consensus HIV-1 sequences was 85,1% for Gag, 93,2% for RT and 92,9% for Prot but many mutations were observed within optimal epitopes. Mutated epitopes had TAP and proteasome scores comparable with wild-type epitopes. MHC scores were significantly lower in mutated epitopes with a media of 2.3 ( $\pm$  0.9) versus 2 ( $\pm$  0.7) in non mutated epitopes ( $p < 0.0001$ ).

## **Conclusions**

Our study confirms the large predominance of CRF01\_AE in the Mekong delta area (Vietnam) where patients harbor a specific HLA pattern. Moreover, it demonstrates the lower MHC binding affinity among mutated epitopes. This weak immune pressure combined to a specific genetic diversity favors immune escape and could explain why CRF01\_AE has emerged and spread so rapidly in Southern Asia since 1990 where it is still largely predominant.

## INTRODUCTION

Since its introduction into humans, HIV-1 has undergone dramatic diversification, extensively spreading in all the continents and rapidly diversifying in Caucasian, African and Asian populations. The radial evolution of group M led to multiple clades or subtypes (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J and K), all of which circulating in African populations. To date 11 HIV-1 subtypes and 48 circulating recombinant forms have been described worldwide. HIV-1 subtype B predominates into the Caucasian populations of Europe and the Americas, HIV-1 subtype C in South Asia, CRF01\_AE in South East Asia, whereas B, C inter-subtype and recombinants are largely responsible for the current AIDS epidemic in the population of China<sup>1,2</sup>. The underlying reason why the distribution of the different HIV-1 subtypes is so heterogeneous and unbalanced is not clear. One hypothesis is related to the host genetic. The rapid spread of some subtypes or/and recombinants in Oriental populations could be a consequence of the relative genetic homogeneity of these populations which contrasts with the extreme genetic diversity of Africans<sup>3,4,5</sup>.

HLA class I molecules play a critical role in defining the epitopes of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) which are of primary importance in host viral defense against HIV<sup>6</sup>. Large cohort studies have shown that certain HLA class I alleles correlate with HIV control, HLA B\*5701 being the most consistently recognized association with immune control of infection<sup>7,8,9,10</sup>. Moreover homozygosity is associated with faster progression to AIDS suggesting that heterozygosity at each HLA class I allele allows for presentation of a greater range of epitopes and a more effective control of HIV replication<sup>11,12</sup>.

Mutations affecting HLA restricted epitopes may lead to immune escape if they

impact on epitope antigen processing, HLA binding or TCR recognition. Several studies have identified a growing number of epitope mutations leading to immune escape specially in Caucasian populations infected with subtype B or African populations infected with subtype C<sup>13,14,15</sup>.

In Vietnam, we and others have demonstrated that CRF01\_AE is largely predominant but little is known about the impact of epitope mutations observed among Asian HIV-1 infected patients on CTL recognition<sup>16,17,18,19</sup>.

The aim of this study is to (i) Describe HIV-1 subtypes circulating in a non explored area, Mekong delta region, Vietnam, among ART-naïve patients (ii) Analyse the polymorphism of Gag and RT-Prot sequences and (iii) Assess the impact of amino acids mutations within CRF01\_AE epitopes on antigen processing and HLA binding among this host Vietnamese population.

## **METHODS**

### **Ethical statement**

This study was approved by the Ethics Committee of the Vietnamese Ministry of Public Health and was conducted in accordance with the set guidelines for research. All patients provided their written informed consent for the collection of the samples and their subsequent analysis.

### **Population and samples**

We recruited 125 chronically HIV-1-infected people from 5 centers for preventive medicine located in the provincial cities of the Mekong delta (Vietnam): Dong Nai, Vung Tau, Tien Giang, An Giang and Dong Thap (**Figure 1**). We obtained one blood

sample from each patient and the recruitment was conducted from June to October 2008.

There were 80 men and 45 women, mostly drug users or sexually transmitted disease patients. The median age was 30 (20-50) years. The majority of patients were naive to antiretroviral therapy, except for 3 individuals who were receiving treatment. The median (interquartile range, IQR) CD4<sup>+</sup> cell count in our study population was 147 cells/ $\mu$ L and the plasma viral load was unknown. Clinical staging of the patients was as follow according to the WHO classification: 32 % stage I, 27 % stage II, 35 % stage III, 6 % stage IV.

### **HLA class I typing**

HLA typing was performed with a DNA-based method (SSP for Sequence Specific Primers)

### **Allele frequencies and linkage disequilibrium**

Allele and haplotype frequencies as well as linkage disequilibrium between all pairs of HLA loci were obtained with the HLA Frequency Analysis Tool of the Los Alamos HIV Immunology Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tools-links.html>). Frequency data for other populations were obtained from previous studies: Kinh Vietnamese<sup>20</sup>, Chinese and European<sup>21</sup>.

### **PCR amplification of HIV-1 RT, Gag and Prot, and sequencing**

Blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and plasma was separated and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were counted with a FACScan flowcytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

Viral RNA was extracted from 200 µl of plasma samples using MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit-High Performance kit with the MagNA Pure LC system ((Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). HIV regions were amplified by RT-PCR using Titan One Tube kit (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) followed by nested PCR using the Amplitaq Gold with GeneAmp Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA). The protease gene was amplified and sequenced according to the ANRS procedure and Gag gene as previously described<sup>17</sup>. The whole RT gene was obtained by using 3 sets of primers, corresponding to polymerase (outer primers : MJ3 5'-AGTAGGACCTACACCTGTCA-3' and MJ4 5'-CTGTTAGTGCTTTGGTTCCTCT-3'; inner primers : A(35) 5'-TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATT-3' and NE1(35) 5'-CCTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT-3') , thumb-connection (outer primers : 02TCRT5 5'-GGATGGAAAGGATCACCAAGCAAT-3' and 02TCRT3 5'-TGATTTGTTGTCTCAGTTAGGGAA-3 inner primers : 02TCnes5 5'-TGGATGGGATATGAACTCCATCCTGA-3' and 02TCnes3 5'-TTAGCTGCCCCATCTACATCG-3' and RNase H domains (outer primers : 02RNRT5 5'-AAATATGCAAAAAGGAGGTCTGC-3' and 02RNRT3 5'-CAGTCTACTTGTCCATGCATGGC-3'; inner primers : 02RNnes5 5'-GAAACATGGGAAGCATGGTGGATGGAGTA-3' and 02RNnes3 5'-TCTTCTTGGGCTTTATCTATGCCATCTA-3'. PCR products were sequenced on both strands using a CEQ DTCS Quick Start kit on an automated sequencer Beckman CEQ 2000 DNA analyzer system (Beckman Coulter, Fullerton, CA) as previously described<sup>17</sup>. Genotypic resistance was interpreted with the ANRS algorithm v18.

### **Phylogenetic analysis**

The derived nucleotide sequences of RT, prot and Gag regions were aligned by the Clustal W 1.74 alignment program with known reference strains of M, N and O pooled from the HIV-1 gene databank (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Phylogenetic trees were inferred by the neighbor-joining method from matrix distances calculated after gap stripping of alignments, according to a Kimura two-parameter algorithm. The circular trees have been obtained using the on-line tool ITOL (<http://itol.embl.de/>)<sup>22</sup>.

GenBank accession numbers for the sequences reported in this study are X to Y, A and B and Z to W for RT, prot and Gag sequences respectively

### **Sequence alignment and consensus**

Protein sequence analyses were performed using tools available at the Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) Network Protein Sequence Analysis (NPSA) website (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>)<sup>23</sup>. Multiple-sequence alignments of protein sequence obtained from patients were performed with ClustalW using default parameters. A primary consensus Mekong sequence was generated for Gag, RT and Prot and was used for alignment with consensus B and HxB2 strains. Identity was determined as a percentage of strictly conserved aminoacid between the 2 compared sequences.

### **Immune recognition Tools**

The immune epitope database ([www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org)) was used to predict T cell epitope recognition. The different steps involved in the MHC class I antigen presentation pathway were evaluated by three scores : the proteasomal score reflects the efficiency of antigen processing through the total amount of cleavage site usage liberating the peptide C-terminus ; the TAP score predicts the transporter

associated with antigen processing (TAP) transport by estimating the binding of a peptide or its N-terminal prolonged precursors to TAP, with highest affinity for a peptide meaning highest transport rates ; the MHC score defines the epitope affinity for the MHC molecule. All scores are logarithmes values with higher values associated to higher predicted efficiency.

### **Statistical analysis**

Comparisons between two groups were performed with the paired t-test using GraphPad Prism version 4.00 for Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A  $p \leq 0.05$  was considered as statistically significant.

## **RESULTS**

### **Sequence analysis**

Sequence genotyping was performed for 105 samples. All RT, Prot and Gag sequences clustered with subtype CRF01\_AE (data not shown). Interestingly, we could observe amino acid substitutions at positions of drug resistance according to the international list of surveillance drug-resistance mutations (SDRMs) updated in 2009<sup>24</sup>. All CRF01\_AE patients were susceptible to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs) except the 7 samples described in **Table 1**. None of these 7 patients was on treatment. The most common mutations affected NNRTI treatments (efavirenz and nevirapine). Minor resistance mutations were also observed to tipranavir, darunavir and etravirine, reflecting natural polymorphisms of CRF01\_AE.

In one patient, we noticed the 46I mutation which is registered as a DMR except in CRF01\_AE where it can be observed as polymorphism<sup>24</sup>.

A CRF01\_AE Vietnamese natural consensus including mutation polymorphisms present in more than 50% of the sequences was established for Gag, RT and Prot proteins (**Figures 2A** and **2B**, data not shown for Prot). Our Mekong consensus sequence was in agreement with the CRF01\_AE consensus observed among Southeast Asian untreated patients and described in previous studies with a percentage of homology above 98 % (data not shown). The percentage of homology between the Mekong and B consensus sequences were 93.2%, 92.9% and 85.1% for RT, Prot and Gag amino acid sequences respectively (92.5%, 90.9% and 85.3% respectively with the HxB2 strain).

Using this consensus sequence, we could focus our analysis on mutation polymorphisms present in optimal CTL epitopes as defined in Los Alamos database. **Figures 3A** and **3B** depict the location and HLA restriction elements of CTL epitopes on Gag and RT sequences on HxB2 aligned with the CRF01\_AE Vietnamese consensus sequence.

A detailed analysis of amino acid substitutions in epitopic regions was assessed for RT, Gag and prot sequences and compared to the reference strain HxB2. We found a high number of mutation polymorphisms present in optimal CTL epitopes as defined in Los Alamos database. The analysis was accurately performed for 106 optimal CTL epitopes displayed by Gag, RT and Prot proteins. The proportion of epitopes mutated was 45.2% (19/42) in RT-Prot protein and 57.8 % (37/64) in Gag protein. Indeed, 13 RT epitopes presented more than 60% of identity with HxB2 epitopes, and 20 RT epitopes exhibited lower percentage of identity including 13 highly mutated epitopes, *ie* epitopes with conserved mutation among all patients

sequences (*proportion of 60.6% mutated RT epitope*). Concerning Gag, more than 60% of identity between Mekong and HxB2 epitope sequences was observed for 20 epitopes. Among the 44 epitopes with low identity, 24 were highly mutated (*corresponding to a proportion of 68.7% of the Gag epitopes*).

### **HLA Class I typing**

HLA class I typing was performed for 116 patients. The number of HLA-A, HLA-B and HLA-C alleles detected in this study was 21, 42 and 21 respectively. The five most representative HLA Class I alleles of Mekong population are represented in **Figure 4** and compared to three other populations: Vietnamese, Chinese and Caucasian people.

The most frequent HLA-A allele was A\*1101, followed by A\*2402, A\*3303 and A\*0203, with a frequency of 23.7%, 13.8%, 10.3%, and 9.4%, respectively. A\*0207 and A\*2901 were also common with a frequency of 6.9% and 5.9%, respectively. The most frequent HLA-B allele was B\*1502, followed by B\*3802, B\*0705 and B\*4601 present in 14.5%, 8.5%, 8% and 7.5% of the population, respectively. B\*1512 and B\*5801 were found at a frequency of 5%. Among HLA Cw alleles, Cw\*0801, Cw\*0702, Cw\*0102, Cw\*0304 and Cw\*0303 were predominant with a frequency of 17.6%, 15.7%, 11.1%, 8.3% and 7.9%, respectively. Moreover we calculated the linkage disequilibrium in this population and found that most of the pairwise associations were statistically significant with a p value < 0.001. The most frequent two-locus haplotypes were B\*1502-Cw\*0801 (23.3%), B\*3802-Cw\*0702 (14.7%) and B\*4601-Cw\*0102 (12.1%). The 2 most common three-locus haplotypes were A\*2901-B\*0705-Cw\*1504 and A\*2901-B\*0705-Cw\*1505 with a frequency of 9.5%.

## Epitope Processing and HLA binding predictions

We then focused our analysis on amino acid mutations observed inside CTL epitopes in the 105 Vietnamese RT-prot and Gag sequences according to the HLA restriction. We found 50 epitopes of interest presenting one to three mutations. For each mutated CTL epitope described in the Vietnamese sequences, we predicted its processing into the cell and its binding to HLA molecules through proteasome, TAP and MHC scores (**Figure 5**). These scores of mutated epitopes were matched and compared with those obtained with CTL epitopes described in subtype B. The analysis was performed extensively for each HLA restriction whenever the data were available on the iedb database.

Forty-seven different HLA-restricted epitopes were analysed (**Table 2**). Comparisons of the three scores in each group of epitopes are presented in Figure 5. Proteasome and TAP score were comparable in mutated and wild-type epitopes with a media ( $\pm$  SD) of 1.4 ( $\pm$  0.3) in each group for the proteasome score and a media ( $\pm$  SD) of 0.42 ( $\pm$  0.3) for wild-type epitopes versus 0.38 ( $\pm$  0.3) for mutated epitopes. The differences were not significant. MHC scores were significantly lower in mutated epitopes with a media of 2.3 ( $\pm$  0.9) versus 2 ( $\pm$  0.7) in wild-type epitopes ( $p < 0.0001$ ). In order to refine the results, we analysed the data according to the  $IC_{50}$  of each epitope (provided on the iedb database) based on the rough guideline that peptides with  $IC_{50}$  values  $< 50$  nM are considered as high affinity,  $< 500$  nM intermediate affinity and  $< 5000$  nM low affinity peptides. We found 15 epitopes (highlighted in grey in **Table 2**) for which the mutations induced a significant change in their affinity ranking with a decrease of binding affinity for 10 out of 15 epitopes and an increase for 5 out of 15 epitopes.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

HIV-1 diversity is modulated at a population level by the host immune pressure which induces a high rate of mutations into immunodominant epitopes recognized by the prevalent HLA class I alleles in these populations. CTL escape mutations occur at critical sites within HLA-restricted CTL epitopes where an amino acid substitution may abrogate epitope-HLA binding, reduce T cell receptor recognition, impair antigen processing or generate antagonistic CTL responses<sup>25</sup>. These mutations result in CTL immune escape but could lead to a severe fitness cost to the virus<sup>26</sup>. Determine the exact kinetics and dynamics of the duel between host and virus is always a challenge. When HIV is transmitted from person to person, mutational escape and reversion rapidly shape HIV evolution. The existing global HIV-1 diversity is the result of cumulative infections followed by intra-host viral evolution and the gold standard to analyse it is to provide a comprehensive immunologic and virologic analysis in the context of an acute infection<sup>27</sup>. Because of the difficulty of identifying very early cases of HIV transmission this type of study is always infrequent.

The present study focuses on MHC class I antigen presentation of optimal CTL HIV-1 epitopes across a chronically infected HLA-diverse host population. Patients were HIV-1 infected and antiretroviral naive (except 3), from 5 provincial cities near the Mekong delta, Vietnam. Our phylogenetic analyses confirmed that HIV-1 CRF01\_AE is the unique strain circulating in Southern Vietnam as it was expected. Indeed, since the first case of HIV-1 infection was detected in Ho Chi Minh City in 1990, the recombinant CRF01\_AE strain is still largely predominant in Vietnam although subtype B, subtype C, and intersubtype recombinants have also been identified<sup>16,17,18,19,28</sup>. This large predominance despite individual genetic variability

and continuous human influx and efflux remains to be understood. One possible explanation could be a more efficient transmission of the virus. Interestingly, a study in a longitudinal cohort of injection-drug users in Thailand conducted from 1995 through 1998 found an increased probability of transmission of CRF01\_AE as compared with sub-type B, though it was unclear whether epidemiologic, virologic, or host factors were affecting viral spread<sup>29</sup>.

The analysis of drug resistance mutations on RT-Prot sequences showed 7 ARV-resistant mutants among 122 ART-naïve patients (6.7%), mostly NNRTI mutations. These results are consistent with a recent study in Northern Vietnam in 2008 where a prevalence of 4.4% was detected for RTI mutations in contrast with a prevalence of 1.7% for PI, probably due to the still limited use of PI in Vietnam<sup>18</sup>. Moreover, even if we consider that these mutations are SDRMs, our high rate of NNRTI mutations could have been overestimated because of the possibility of unreported contact with ARV, like a single dose nevirapine.

Our study also shows the distribution of HLA-A, B, and C alleles and haplotypes by high-resolution DNA typing in the Vietnamese population living around the Delta Mekong. Although there have been a few studies on HLA typing of Vietnamese population, there is only one comprehensive four-digit typing report of HLA class I alleles harbored by the Kinh population in Vietnam, the most prevalent ethnic group of this country<sup>20</sup>. Our results are consistent with this last study. We clearly show that HLA A\*1101 and B\*4601, which are depicted as Asian alleles, are largely present in our cohort with a high predominance of HLA A\*1101 among HLA-A alleles whereas the prevalence for both alleles is about 5.6 % and 0% in European people, respectively<sup>21</sup>. Some other alleles as A\*2901, B\*0705 and B\*1512 appear more specific to the Vietnamese population with a frequency above 5% in comparison with

a frequency below 0.5% in Chinese and European<sup>21</sup>. The two major three-digit haplotypes found in our study are A\*2901-B\*0705-Cw\*1504 (9,5%) and A\*2901-B\*0705-Cw\*1505 (9,5%) which have not been described in Asia and Europe so far and could be a unique feature of the Vietnamese population as it has already been reported by Hoa and colleagues<sup>20</sup>.

These remarkable diversity and specificity of the HLA class I molecules constantly modify immune responses, but the relative impact of these forces on the evolution of HIV at the population level is difficult to evaluate. It has been suggested that virus-clade-specific differences could result at least in part from the impact of HLA differences between populations living in distinct regions of the world. Indeed, escape mutations within CD8+ T-cell epitopes can be transmitted relatively frequently and persist in HIV-mismatched recipients, thereby accumulating over time to ultimately represent the most prevalent form of the virus<sup>13,30,31,32</sup>.

In our study, we aimed to analyze the impact of mutations within CTL epitopes located in Gag and RT-Prot among Vietnamese HIV-1 strains on HLA class I binding recognition. Results were compared to HLA class I binding recognition of wild-type CTL epitopes from the reference HxB2. Our analysis showed that there is a high degree of polymorphism of CRF01\_AE strains compared to the HxB2 reference strain or subtype B strain. Mutations within CRF01\_AE CTL epitopes did not modify antigen processing evaluated by TAP and proteasome score. However the MHC binding was drastically reduced. So far, viral escape via mutations within CTL epitopes has been well documented and in most of the cases, the mutation occurred within the epitope leading either to a reduction in binding to the MHC class I molecule and/or an alteration of T cell receptor recognition. Mutations affecting antigen processing have been reported in portable flanking sequences but the impact of

these mutations could not be assessed in our study in the absence of *in vitro* experiments, limited in our study in the absence of cells available from the blood samples<sup>33</sup>. For our study, all predictions of HLA class I presentation were conducted using T cell predictions from the Immune Epitope DataBase. Even if these predictions have been developed using experimental data, they have to be interpreted with extra caution. Proteasome score is the logarithm of the total amount of cleavage site usage liberating the peptide C-terminus. It does not take into account other factors such as the amount of source protein degraded, the type of cell involved in the protein degradation<sup>34</sup> or the amount of immunoproteasome. Moreover, this software was set up with a limited number of HLA alleles A and B. We could not obtain the data for various HLA-A and HLA-B alleles which were common in our Vietnamese population : A\*3303, A\*0207, A\*2901, B\*3802, B\*0705 and B\*1512 and no data were available for HLA Cw alleles.

It is also important to note that in the absence of *in vitro* analysis, notably ELISpot, compensatory and new CTL responses could not be detected<sup>35</sup>, as well as cross reactive immune responses as it has been shown with subtype A, CRF01\_AE and CRF02\_AG<sup>36</sup>.

However, beside these limitations and in the context of a chronic infection, we demonstrate that in a homogeneous HLA diverse population from Mekong Delta, Vietnam, MHC binding of known CTL epitopes is strongly reduced due to intraepitopic mutations, facilitating immune evasion of Vietnamese HIV-1 strains. This weak immune pressure combined to a low genetic diversity could explain why CRF01\_AE has emerged and spread so rapidly in Southern Asia since 1990.

## REFERENCES

1. Kilmarx PH. Global epidemiology of HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4:240-6.
2. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;358:1590-602.
3. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol* 2008;69:443-64.
4. Tishkoff SA, Kidd KK. Implications of biogeography of human populations for 'race' and medicine. *Nat Genet* 2004;36:S21-7.
5. Abdulla MA, Ahmed I, Assawamakin A, et al. Mapping human genetic diversity in Asia. *Science* 2009;326:1541-5.
6. Bangham CR. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol* 2009;39:1700-12.
7. Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES, et al. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2003;17:2581-91.
8. Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* 2006;203:1357-69.
9. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2709-14.
10. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 2005;41:1053-6.
11. Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* 1999;283:1748-52.
12. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 2003;54:535-51.
13. Brumme ZL, John M, Carlson JM, et al. HLA-associated immune escape pathways in HIV-1 subtype B Gag, Pol and Nef proteins. *PLoS One* 2009;4:e6687.
14. Wright JK, Brumme ZL, Carlson JM, et al. Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters. *J Virol* 2010;84:10820-31.
15. Rolland M, Carlson JM, Manochew S, et al. Amino-acid co-variation in HIV-1 Gag subtype C: HLA-mediated selection pressure and compensatory dynamics. *PLoS One* 2010;5.
16. Lan NT, Recordon-Pinson P, Hung PV, et al. HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large predominance of CRF01\_AE and presence of major resistance mutations to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:925-8.
17. Lazaro E, Theodorou I, Legrand E, et al. Sequences of clustered epitopes in Gag and Nef potentially presented by predominant class I human leukocyte antigen (HLA) alleles A and B expressed by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients in Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:586-91.
18. Phan TT, Ishizaki A, Phung DC, Bi X, Oka S, Ichimura H. Characterization of HIV type 1 genotypes and drug resistance mutations among drug-naïve HIV type 1-infected patients in Northern Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26:233-5.
19. Ishizaki A, Cuong NH, Thuc PV, et al. Profile of HIV type 1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naïve HIV type 1-infected individuals in Hai Phong, Viet Nam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:175-82.
20. Hoa BK, Hang NT, Kashiwase K, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes in the Kinh population in Vietnam. *Tissue Antigens* 2008;71:127-34.
21. Maiers M, Gragert L, Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum Immunol* 2007;68:779-88.
22. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 2007;23:127-8.
23. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 2000;25:147-50.

24. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009;4:e4724.
25. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001;410:980-7.
26. Kent SJ, Fernandez CS, Dale CJ, Davenport MP. Reversion of immune escape HIV variants upon transmission: insights into effective viral immunity. *Trends Microbiol* 2005;13:243-6.
27. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010;10:11-23.
28. Lau KA, Wang B, Saksena NK. Emerging trends of HIV epidemiology in Asia. *AIDS Rev* 2007;9:218-29.
29. Hudgens MG, Longini IM, Jr., Vanichseni S, et al. Subtype-specific transmission probabilities for human immunodeficiency virus type 1 among injecting drug users in Bangkok, Thailand. *Am J Epidemiol* 2002;155:159-68.
30. Draenert R, Le Gall S, Pfafferoth KJ, et al. Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med* 2004;199:905-15.
31. Leslie A, Kavanagh D, Honeyborne I, et al. Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA. *J Exp Med* 2005;201:891-902.
32. Brumme ZL, Walker BD. Tracking the culprit: HIV-1 evolution and immune selection revealed by single-genome amplification. *J Exp Med* 2009;206:1215-8.
33. Le Gall S, Stamegna P, Walker BD. Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* 2007;117:3563-75.
34. Lazaro E, Godfrey SB, Stamegna P, et al. Differential HIV epitope processing in monocytes and CD4 T cells affects cytotoxic T lymphocyte recognition. *J Infect Dis* 2009;200:236-43.
35. Maisnier-Patin S, Andersson DI. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Res Microbiol* 2004;155:360-9.
36. Aidoo M, Sawadogo S, Bile EC, Yang C, Nkengasong JN, McNicholl JM. Viral, HLA and T cell elements in cross-reactive immune responses to HIV-1 subtype A, CRF01\_AE and CRF02\_AG vaccine sequence in Ivorian blood donors. *Vaccine* 2008;26:4830-9.

**Figure 1** : Mekong delta cities participating into the study



**Figures 2A and 2B : CRF01\_AE Vietnamese consensus sequences of Gag (A) and RT (B) aligned with the consensus B strain.**

*Identiques amino acids between both sequences are indicated by stars below the alignment. Differences are indicated by spaces ; colons and dots symbols indicate aligned residues showing strong and weak similarities respectively.*

**Figure 2A :**

|                      |                                                                  |     |     |     |     |     |
|----------------------|------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                      | 10                                                               | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |
| CONSENSUS_B_GAG      | MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCROI     |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRMKHLVWASRELERFALNPGLLETAEQCQOI      |     |     |     |     |     |
|                      | *****: ** *****: :*: *****: *****: ***: **                       |     |     |     |     |     |
|                      | 70                                                               | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 |
| CONSENSUS_B_GAG      | LGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALEKIEEEQNKSKKKAQAAAA    |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | IEQLQSTLKTGSEELKSLFNTVATLWCVHQRIEVKDTKEALDKIEEVQNKSSQKQTQAAA     |     |     |     |     |     |
|                      | : ***.: *: *****: *: *****: *****: *****: *****: *****: *: ***** |     |     |     |     |     |
|                      | 130                                                              | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CONSENSUS_B_GAG      | DTGNSS-QVSNYPYIVQNLQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGA    |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | DTGSSSSKVSQNYPIVQNAQGQMVHQPLSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIPMFSALSEGA     |     |     |     |     |     |
|                      | ***. ** : ***** *****.: *****: *****.: * *****                   |     |     |     |     |     |
|                      | 190                                                              | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| CONSENSUS_B_GAG      | TPQDLNMTLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGT     |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | TPQDLNMTLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIPPGQMREPRGSDIAGT     |     |     |     |     |     |
|                      | ***** ** *****: *****: *****: *****                              |     |     |     |     |     |
|                      | 250                                                              | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| CONSENSUS_B_GAG      | TSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPRDYVDR      |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | TSTLQEQIGWMTSNPPIPVGDIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPRDYVDR      |     |     |     |     |     |
|                      | *****.: *****: *****: *****: *****: *****: *****                 |     |     |     |     |     |
|                      | 310                                                              | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| CONSENSUS_B_GAG      | FYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHK    |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | FYKTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILKALGTGATLEEMMTACQGVGGPSHK    |     |     |     |     |     |
|                      | *****.: *****: *****.: *****.: *****: *****                      |     |     |     |     |     |
|                      | 370                                                              | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| CONSENSUS_B_GAG      | ARVLAEAMSQVTNSATIMMQRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHIKNCRAPRKKGCWKCGKE      |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | ARVLAEAMSHVQQTN-IMMQRGNFKGQ-KRIKCFNCGKEGHLARNCRAPRKKGCWKCGKE     |     |     |     |     |     |
|                      | *****: * : : *****: . * * : *****: *: *****                      |     |     |     |     |     |
|                      | 430                                                              | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| CONSENSUS_B_GAG      | GHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNLFQSRPEPTAPPEESFRFGEETTTSPQKQEPPI    |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | GHQMKDCTERQANFLGKIWPSNKGKPGNFPQSRTPEPTAPPAENWGMGEEITS-SLKQEQK    |     |     |     |     |     |
|                      | *****: *****: ***** *****.: ***** *: *****: *                    |     |     |     |     |     |
|                      | 490                                                              | 500 |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_GAG      | DKELYP-LASLRSLFGNDPSSQ                                           |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_GAG | DKEHPPPSISLKSFLGNDPLSQ                                           |     |     |     |     |     |
|                      | *** * **: ***** **                                               |     |     |     |     |     |

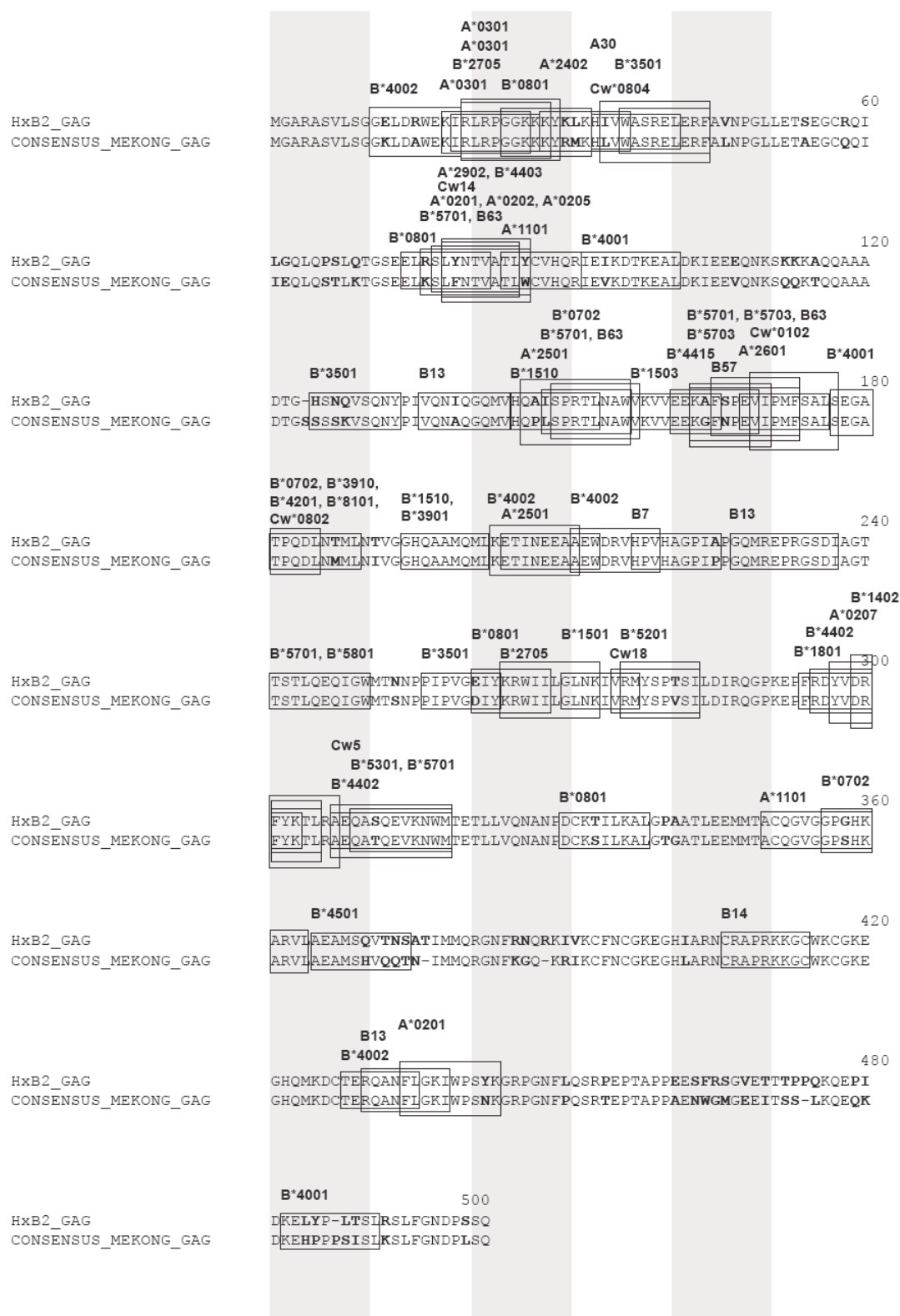
**Figure 2B :**

|                     |                                                                |     |     |     |     |     |
|---------------------|----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| CONSENSUS_B_RT      | 10                                                             | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | KPGMDGPKVKQWPLTEEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWR  |     |     |     |     |     |
|                     | KPGMDGPKVKQWPLTEEEKIKALTEICKEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWR  |     |     |     |     |     |
|                     | *****.***.*****                                                |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 70                                                             | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | KLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTI   |     |     |     |     |     |
|                     | KLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDESFRKYTAFTI   |     |     |     |     |     |
|                     | *****;.*****                                                   |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 130                                                            | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | PSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDLTVGSD    |     |     |     |     |     |
|                     | PSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTKILEPFRKNPEIVIYQYMDL-VGSD     |     |     |     |     |     |
|                     | *****.*****;*:*****                                            |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 190                                                            | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | LEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSW   |     |     |     |     |     |
|                     | LEIGQHRTKIEELRAHLLSWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDRWTVQPIELPEKDSW   |     |     |     |     |     |
|                     | ***** ** *****;*****                                           |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 250                                                            | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | TVNDIQKLVGKLNWASQIYAGIKVKQLCKLLRGTKALTEVIPLTEEALELAENREILKE    |     |     |     |     |     |
|                     | TVNDIQKLVGKLNWASQIYAGIKVKQLCKLLRGAKALTDIVPLTEEALELAENREILKT    |     |     |     |     |     |
|                     | *****.***:;*****                                               |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 310                                                            | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | PVHGVYYDPSKDLIAEIQKGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGHAHTNDVKQLTEAV    |     |     |     |     |     |
|                     | PVHGVYYDPSKDLIAEVQKGQDQWTYQIYQEPFKNLKTGKYARKSAHTNDVRQLTEVV     |     |     |     |     |     |
|                     | *****;*****.*****;*****.***                                    |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 370                                                            | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | QKIATESIVIWGKTPKFKLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKE    |     |     |     |     |     |
|                     | QKIATESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWMEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKD    |     |     |     |     |     |
|                     | *****;*****;***** *****;*****                                  |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 430                                                            | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | PIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTDGRQKVVS�TDITNQTTELQAIHLALQDSGLE    |     |     |     |     |     |
|                     | PIVGAETFYVDGAASRETKLGKAGYVTDGRQKVVS�TETNQTTELHAIHLALQDSGSE     |     |     |     |     |     |
|                     | *****.*****;*****;***** *                                      |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | 490                                                            | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | VNIVTDSQYALGIIQAQPDKSESELVSQIIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVQDKLV |     |     |     |     |     |
|                     | VNIVTDSQYALGIIQAQPDSESEVVNQIIIEELIKKEKVYLSWVPAHKGIGGNEQVQDKLV  |     |     |     |     |     |
|                     | *****;***:*.***;*****;*****                                    |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_B_RT      | S                                                              |     |     |     |     |     |
| CONSENSUS_MEKONG_RT | S                                                              |     |     |     |     |     |
|                     | *                                                              |     |     |     |     |     |

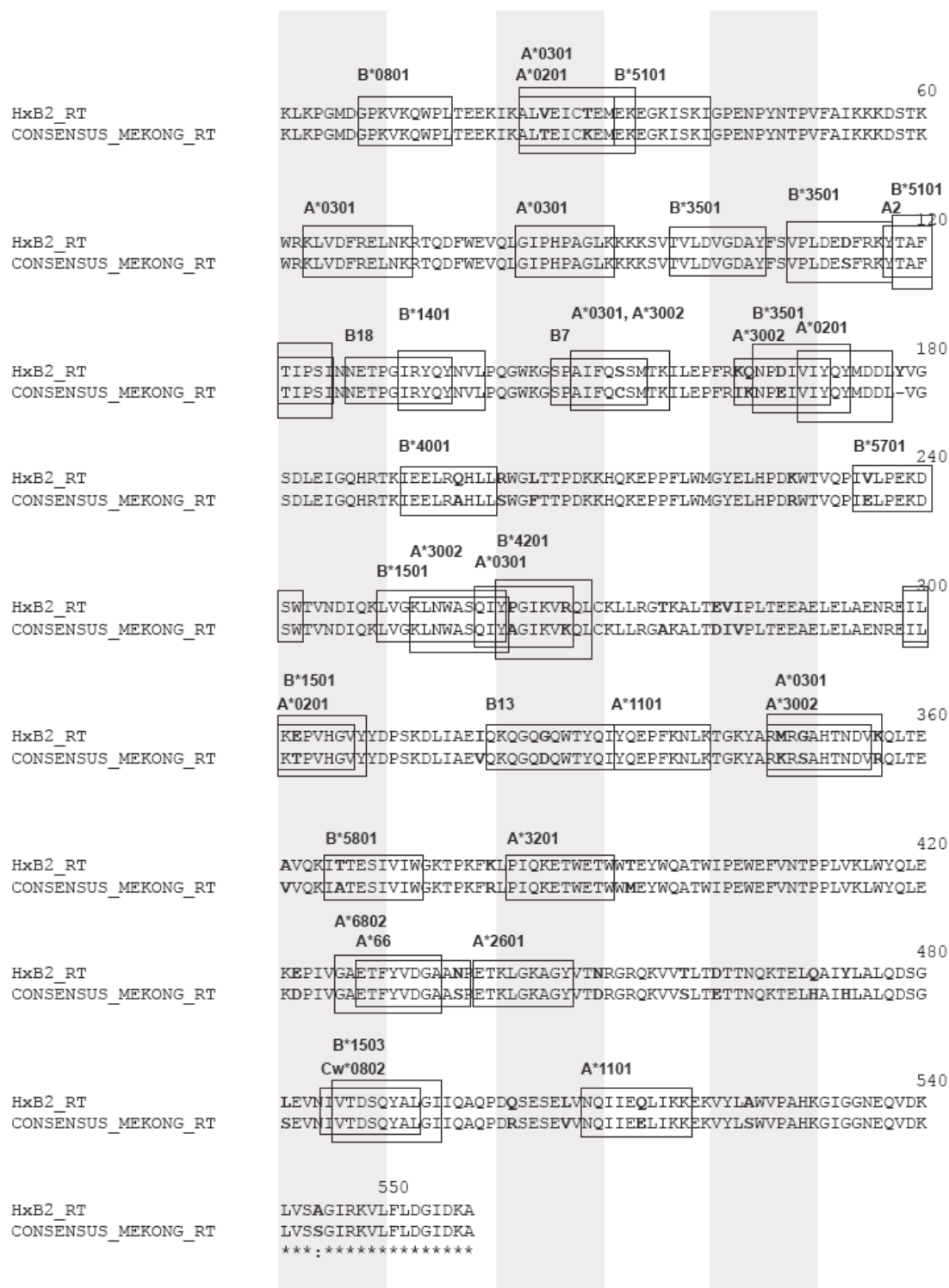
**Figures 3A and 3B : Comparison of Gag (A) and RT (B) Vietnamese consensus sequences with HxB2 strains.**

*Optimal CTL epitopes are highlighted by boxes. HLA restriction is indicated on the corresponding epitopes. Amino acid substitutions are indicated in bold. Shaded vertical bars separate blocks of 10 amino acids.*

Figure 3A

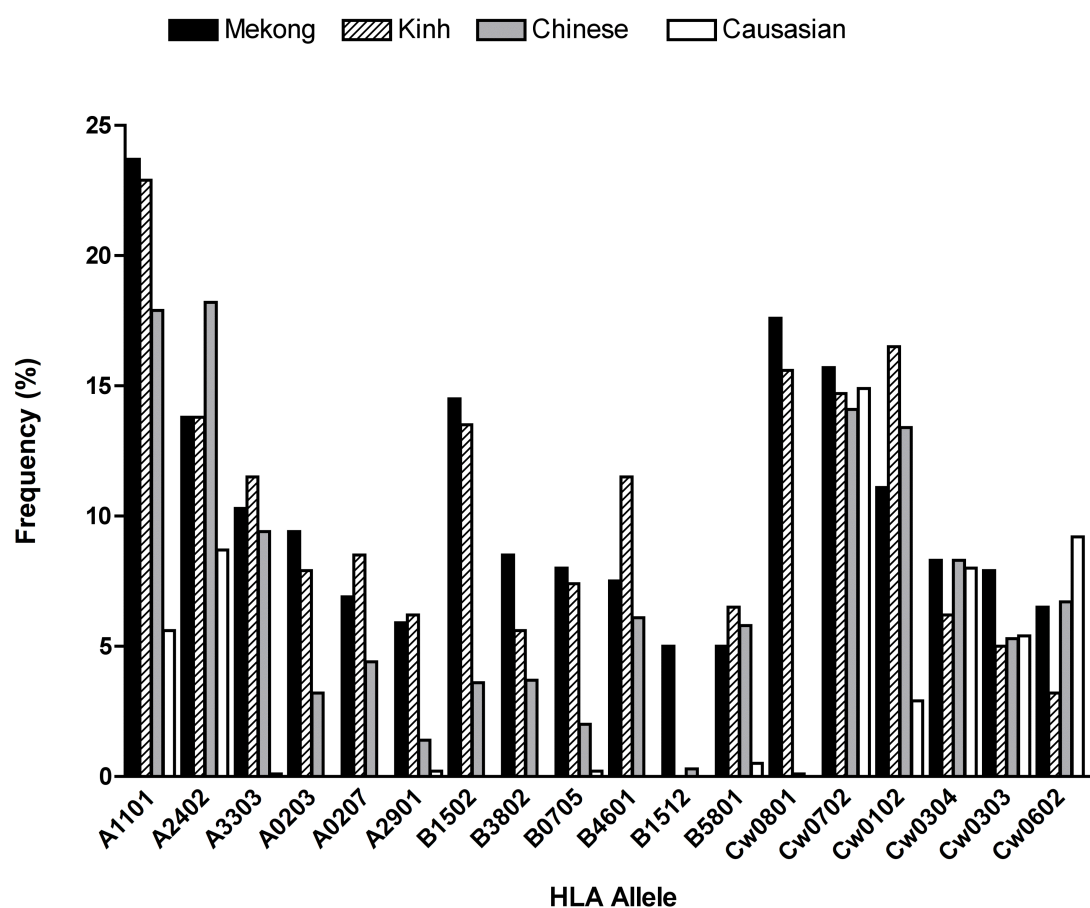


**Figure 3B**



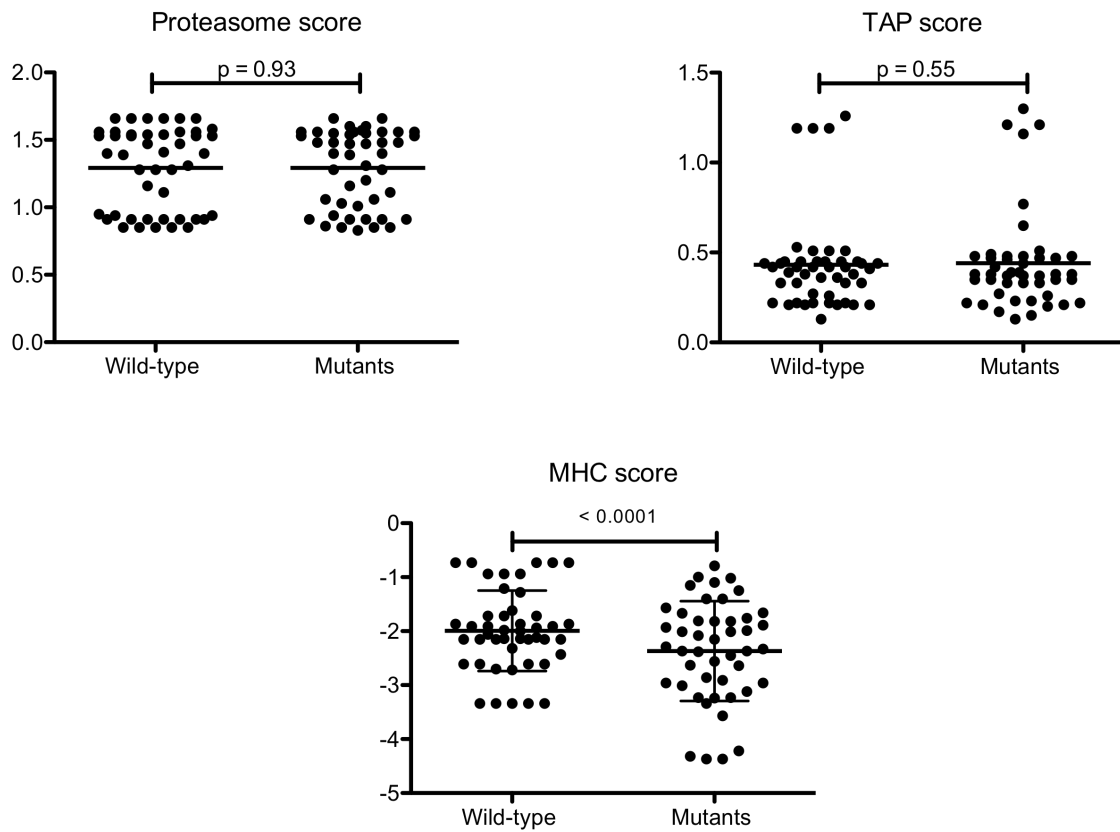
**Figure 4 : HLA allele frequencies in the Vietnamese Mekong Delta population (n=116) compared to Kinh Vietnamese (dashed bars), Chinese (grey bars) and European (white bars) population.**

*The 6 most representative HLA alleles of Mekong population are represented.*



**Figure 5 : Comparisons of proteasome, TAP and MHC scores between wild-type and mutated epitopes.**

*All scores are logarithmiques values, high values corresponding to high predicted efficiency.*



**Table 1 : Drug resistance mutation (DRM) in RT sequences according to the international list of surveillance drug-resistance mutations (SDRMs) updated in 2009 [Bennet et al].**

| Sample ID | RT DRMs               | NRTI and NNRTI resistance |
|-----------|-----------------------|---------------------------|
| DN-M3     | 230L                  | NVP, EFV                  |
| DT-M8     | 181C                  | NVP, EFV                  |
| DT-M9     | 65R, 181C             | TDF, NVP, EFV             |
| DT-M12    | 103N, 190A            | NVP, EFV                  |
| DT-M15    | 184V, 181I            | 3TC, NVP, EFV             |
| DT-M24    | 103N                  | NVP, EFV                  |
| DT-M19    | 98G, 106I, 181C, 188V | NVP, EFV, ETV             |

NVP=nevirapine, EFV=efavirenz, TDF=tenofovir, 3TC=lamivudine, ETV=etravirine

**Table 2: Proteasome, TAP and MHC score of CTL epitopes.**

| HLA   | Protein location | Wild Type Epitope | Prot. Score | TAP Score | MHC Score | MHC IC <sub>50</sub> [nM] | Mutated Epitope | Prot. Score | TAP Score | MHC Score | MHC IC <sub>50</sub> [nM] |
|-------|------------------|-------------------|-------------|-----------|-----------|---------------------------|-----------------|-------------|-----------|-----------|---------------------------|
| A2402 | p17              | KYKCLKHIVW        | 1,66        | 0,45      | -2,15     | 142,8                     | KYHMKHIVW       | 1,6         | 0,46      | -2,15     | 142                       |
| A2402 | p17              | KYKCLKHIVW        | 1,66        | 0,45      | -2,15     | 142,8                     | KYRLKHIVW       | 1,66        | 0,47      | -2,33     | 212,9                     |
| A2402 | p17              | KYKCLKHIVW        | 1,66        | 0,45      | -2,15     | 142,8                     | KYRMKHIVW       | 1,6         | 0,47      | -2,38     | 237,4                     |
| A2402 | p17              | KYKCLKHIVW        | 1,66        | 0,45      | -2,15     | 142,8                     | KYRMKHLVW       | 1,56        | 0,47      | -2,08     | 121                       |
| A2402 | p17              | KYKCLKHIVW        | 1,66        | 0,45      | -2,15     | 142,8                     | QYKCLKHIVW      | 1,66        | 0,38      | -2,63     | 422,3                     |
| A2402 | p17              | KYKCLKHIVW        | 1,66        | 0,45      | -2,15     | 142,8                     | RYRMKHLVW       | 1,56        | 0,48      | -1,99     | 98,4                      |
| B3501 | p17              | HSSQVSQNY         | 1,31        | 1,26      | -1,98     | 95,2                      | SSSKVSQNY       | 1,31        | 1,3       | -3,23     | 1690,9                    |
| B4001 | p17              | IEIKDTKEAL        | 1,56        | 0,44      | -2,61     | 402,8                     | IDIKDTKEAL      | 1,56        | 0,38      | -4,22     | 16458                     |
| B4001 | p17              | IEIKDTKEAL        | 1,56        | 0,44      | -2,61     | 402,8                     | IDVKDTKEAL      | 1,56        | 0,38      | -4,32     | 20736                     |
| B4001 | p17              | IEIKDTKEAL        | 1,56        | 0,44      | -2,61     | 402,8                     | IEVKDTKEAL      | 1,56        | 0,44      | -2,91     | 819                       |
| B4001 | p17              | IEIKDTKEAL        | 1,56        | 0,44      | -2,61     | 402,8                     | IQVKDTKEAL      | 1,56        | 0,49      | -4,37     | 23631,4                   |
| A0201 | p17              | SLYNTVATL         | 1,54        | 0,51      | -1,72     | 53                        | SLFNLVATL       | 1,55        | 0,48      | -1,4      | 25,1                      |
| A0201 | p17              | SLYNTVATL         | 1,54        | 0,51      | -1,72     | 53                        | SLFNTIATL       | 1,55        | 0,48      | -1,57     | 37                        |
| A0201 | p17              | SLYNTVATL         | 1,54        | 0,51      | -1,72     | 53                        | SLFNTVATL       | 1,54        | 0,48      | -1,66     | 45,9                      |
| A2601 | p24              | EVIPMFSA          | 1,41        | 0,39      | -1,21     | 16,3                      | EVIPMFTA        | 1,48        | 0,39      | -1,93     | 85,5                      |
| B0702 | p24              | TPQDLNMTL         | 1,58        | 0,27      | -2,72     | 526,8                     | TPQDLNMML       | 1,57        | 0,27      | -2,96     | 920,8                     |
| B5301 | p24              | QASQEVKNW         | 1,47        | 0,36      | -2,32     | 209,7                     | QATQEVKNW       | 1,47        | 0,35      | -2,29     | 193,1                     |
| B5701 | p24              | QASQEVKNW         | 1,47        | 0,36      | -2,43     | 270,5                     | QATQEVKNW       | 1,47        | 0,35      | -2,56     | 360,5                     |
| B5701 | p24              | TSTLQEQIGW        | 1,4         | 0,38      | -1,94     | 87,2                      | TSNLQEQIGW      | 1,4         | 0,35      | -3,24     | 1719,2                    |
| B5801 | p24              | TSTLQEQIGW        | 1,4         | 0,38      | -1,62     | 41,4                      | TSNLQEQIGW      | 1,4         | 0,35      | -2,01     | 102,3                     |
| A0201 | RT               | ALVEICTEM         | 0,94        | 0,22      | -2,14     | 138,1                     | ALTEICKEM       | 1,06        | 0,17      | -2,96     | 907,6                     |
| A0201 | RT               | ALVEICTEM         | 0,94        | 0,22      | -2,14     | 138,1                     | ALIEICTEM       | 0,94        | 0,22      | -1,81     | 64                        |
| A0201 | RT               | VIIQYMDDL         | 1,16        | 0,53      | -2,7      | 500,1                     | IIQYMDDL        | 1,16        | 0,51      | -2,64     | 439                       |
| A0201 | RT               | ILKEPVHGV         | 0,95        | 0,13      | -2,12     | 132                       | ILKTPVHGV       | 1,03        | 0,13      | -2,45     | 281                       |
| A0301 | RT               | AIFQSSMTK         | 0,91        | 0,33      | -1,28     | 18,9                      | AIFQCSMTK       | 0,91        | 0,33      | -1,4      | 25,2                      |
| A1101 | RT               | AIFQSSMTK         | 0,91        | 0,33      | -0,94     | 8,6                       | AIFQCSMIK       | 0,83        | 0,33      | -1,15     | 14,1                      |
| A1101 | RT               | AIFQSSMTK         | 0,91        | 0,33      | -0,94     | 8,6                       | AIFQCSMTK       | 0,91        | 0,33      | -1,1      | 12,5                      |
| A1101 | RT               | AIFQSSMTK         | 0,91        | 0,33      | -0,94     | 8,6                       | AIFQSSMTR       | 1,06        | 0,77      | -1,89     | 77,1                      |
| A1101 | RT               | IYQEPFKNLK        | 0,85        | 0,21      | -3,34     | 2179,4                    | IYQEPFRNLK      | 0,86        | 0,21      | -3,23     | 1699,2                    |
| A1101 | RT               | IYQEPFKNLK        | 0,85        | 0,21      | -3,34     | 2179,4                    | IYQEPFKNLR      | 1,01        | 0,65      | -4,37     | 23411                     |
| A1101 | RT               | IYQEPFKNLK        | 0,85        | 0,21      | -3,34     | 2179,4                    | INQEPFKNLK      | 0,85        | 0,15      | -3,57     | 3751,1                    |
| A1101 | RT               | IYQEPFKNLK        | 0,85        | 0,21      | -3,34     | 2179,4                    | IFQEPFKNLK      | 0,85        | 0,2       | -3,12     | 1303,6                    |
| A1101 | RT               | IYQEPFKNLK        | 0,85        | 0,21      | -3,34     | 2179,4                    | IYQETFKNLK      | 0,85        | 0,21      | -3,34     | 2209,6                    |
| A1101 | RT               | QIIQLIKK          | 0,91        | 0,22      | -1,91     | 81,2                      | QIIELIKK        | 0,91        | 0,22      | -2,01     | 102,6                     |
| A1101 | RT               | QIIQLIKK          | 0,91        | 0,22      | -1,91     | 81,2                      | QIVEELIKK       | 0,91        | 0,23      | -2,37     | 234,4                     |
| A1101 | RT               | QIIQLIKK          | 0,91        | 0,22      | -1,91     | 81,2                      | QVIEELIKK       | 0,91        | 0,23      | -2,37     | 234,4                     |
| A2601 | RT               | ETKLGKAGY         | 1,28        | 1,19      | -1,87     | 73,6                      | ENKQKGAGY       | 1,2         | 1,16      | -3,01     | 1023,6                    |
| A2601 | RT               | ETKLGKAGY         | 1,28        | 1,19      | -1,87     | 73,6                      | ETRLGKAGY       | 1,28        | 1,21      | -1,82     | 66,2                      |
| A2601 | RT               | ETKLGKAGY         | 1,28        | 1,19      | -1,87     | 73,6                      | ETRLGKAGY       | 1,28        | 1,21      | -1,82     | 66,2                      |
| B0801 | RT               | GPKVKQWPL         | 1,11        | 0,26      | -2,06     | 115                       | GPKVRQWPL       | 1,11        | 0,26      | -1,76     | 57,1                      |
| B5701 | RT               | IVLPEKDSW         | 1,39        | 0,41      | -2        | 100,7                     | IELPEKDSW       | 1,39        | 0,39      | -2,86     | 718,8                     |
| B5801 | RT               | IAMESIVIW         | 1,53        | 0,42      | -0,73     | 5,4                       | IATESIIIW       | 1,48        | 0,37      | -1,02     | 10,5                      |
| B5801 | RT               | IAMESIVIW         | 1,53        | 0,42      | -0,73     | 5,4                       | IATESIVIW       | 1,53        | 0,37      | -1        | 10                        |
| B5801 | RT               | IAMESIVIW         | 1,53        | 0,42      | -0,73     | 5,4                       | IVTESIVIW       | 1,53        | 0,38      | -1,67     | 46,4                      |
| B5801 | RT               | IAMESIVIW         | 1,53        | 0,42      | -0,73     | 5,4                       | IAIESIIIW       | 1,48        | 0,42      | -0,79     | 6,2                       |
| B5801 | RT               | IAMESIVIW         | 1,53        | 0,42      | -0,73     | 5,4                       | IATEGIIIW       | 1,48        | 0,37      | -1,25     | 17,6                      |

Wild type epitope scores are matched with the corresponding mutated epitope score. Prot. score = proteasome score. Epitopes for which mutations induce higher MHC binding are highlighted in red. Epitopes for which mutations induce lower MHC binding are highlighted in blue

# Differential HIV Epitope Processing in Monocytes and CD4 T Cells Affects Cytotoxic T Lymphocyte Recognition

Estibaliz Lazaro,<sup>1</sup> Sasha Blue Godfrey,<sup>1</sup> Pamela Stamegna,<sup>1</sup> Tobi Ogbecchie,<sup>1</sup> Christopher Kerrigan,<sup>1</sup> Mei Zhang,<sup>1</sup> Bruce D. Walker,<sup>1,2</sup> and Sylvie Le Gall<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ragon Institute of Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology, and Harvard (formerly Partners AIDS Research Center), Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston; and <sup>2</sup>Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, Maryland

The ability of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) to clear virus-infected cells is dependent on the presentation of viral peptides processed intracellularly and displayed by major histocompatibility complex class I. Most CTL functional assays use exogenously added peptides, a practice that does not account for the kinetics and quantity of antigenic peptides produced by infectable cells. Here, we examined the relative ability of 2 major human immunodeficiency virus–infectable cell subsets—CD4 T lymphocytes and monocytes—to produce antigenic peptides, using cytosol as a source of peptidases and mass spectrometry to define the degradation products. We show clear subset-specific differences in the kinetics of peptide production and the ability of the peptides produced to sensitize cells for lysis by CTLs, with primary CD4 T lymphocytes having significantly lower proteolytic activity than monocytes. These differences in epitope processing by cell subsets may affect the efficiency of CTL-mediated clearance of infected subsets and contribute to the establishment of chronic infection.

The recognition and killing of human immunodeficiency virus (HIV)–infected cells by HIV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) [1] require the presentation of adequate amounts of major histocompatibility complex class I (MHC-I) epitope complexes at the cell surface and subsequent recognition by the T cell receptor (TCR) [2–6]. Most assays used to assess HIV-specific CTL functions rely on exogenous addition of

supraphysiologic concentrations of synthetic peptides to HLA-matched target cells. Such assays allow high-throughput analysis of responses to HIV proteome [7–10] but have failed to show a clear relationship between viral load and the breadth or magnitude of these responses [7, 11–13]. Critical assumptions are inherent in these assays, including assumptions that the specifics of peptide processing do not affect recognition and that there are no cell-specific differences in these parameters.

HIV infects several cellular subsets: CD4 T lymphocytes [14–17], monocytes [18, 19], macrophages [20], and dendritic cells (DCs) [21]. Whether these subsets have equivalent capacity to produce MHC-I-restricted epitopes is unknown. Epitopes originate from proteins undergoing intracellular degradation in antigen-processing pathways involving proteasomes [22], aminopeptidases [23–26], and sometimes, tripeptidylpeptidase II [27, 28] before being loaded onto MHC-I and displayed to CTLs. Differences in antigen-processing activities of HIV-infectable cell subsets may affect the timing and amount of epitopes presented and, potentially, their capacity to be killed by CTLs. In support

Received 20 November 2008; accepted 5 February 2009; electronically published 8 June 2009.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Bill and Melinda Gates Foundation (Collaboration for AIDS Vaccine Discovery to B.D.W. and S.L.G.), Microsoft Research (to S.L.G.), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (AI28568 to B.D.W. and AI60502 to S.L.G.), International AIDS Vaccine Initiative (to B.D.W.), French Ministry of Foreign Affairs (Egide/Lavoisier fellowship to E.L.).

Presented in part: 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, February 2008 (abstract 424).

Reprints or correspondence: Dr. Le Gall, Ragon Institute of MGH, MIT, and Harvard, Harvard Medical School/Massachusetts General Hospital, CNY149 13th St., Boston, MA 02129 (sylvie\_legal@hms.harvard.edu).

**The Journal of Infectious Diseases** 2009;200:236–43

© 2009 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2009/20002-0011\$15.00

DOI: 10.1093/infdis/jin337

of this hypothesis, mouse DC and fibroblast cell lines infected with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) stimulate different LCMV-specific CTL responses despite equal production of viral proteins by the 2 cell lines [29]. Similarly, priming against influenza by DCs and secondary infection of lung macrophages by the same virus stimulate different CTL responses [30]. One possibility is that these differences may be attributable to variations in epitope processing by these cells, but this remains to be demonstrated.

Of interest, primary murine macrophages possess high lysosomal proteolytic activity that results in complete degradation of exogenous antigens, whereas the lower lysosomal hydrolytic activity of DCs and B cells allows incomplete antigen degradation, thus rendering DCs and B cells more efficient in presenting MHC-II epitopes to CD4 T cells [31]. Furthermore, variations in proteasome composition have been observed during DC maturation [32] or within tissues [33], suggesting an overall heterogeneity of the protein degradation machinery. The impact of differences in antigen processing among human cell subsets on the processing of pathogen epitopes and stimulation of CTLs during infection is unknown.

In this study, we compared antigen processing activities in 2 major cell subsets infected by HIV: primary CD4 T lymphocytes and monocytes. We linked antigen processing activities to the kinetics, identity, and amount of viral peptides produced and to the ability of degradation products to sensitize target cells for lysis by cognate CTL clones. The results indicate that epitope processing in these subsets leads to sets of peptides with variable antigenicity, suggesting that the efficacy of CTL-mediated clearance may differ among cell subsets.

## METHODS

**Study participants.** HIV-uninfected and HIV-infected donors were recruited at the Massachusetts General Hospital in Boston. This study was approved by the institutional review board at the hospital. All participants provided written informed consent for participation in the study.

**Cell subset sorting and cytosol preparation.** CD4 T cells were enriched from freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by magnetic immunodepletion of cells expressing CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, TCR- $\gamma\delta$ , or glycophorin A. Monocytes (CD14<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) were enriched by magnetic immunodepletion of cells expressing CD2, CD3, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123, or glycophorin A, according to the manufacturer's instructions (StemCell). The purity of cell subsets was checked by fluorescence-activated cell sorter analysis and reached >96% for CD4 T lymphocytes and >85% for monocytes (unpublished observations). Cytosol was purified detergent free by centrifugation [34] or by 0.0125% digitonin permeabilization [35]. Protein concentration was measured with a protein assay

(Bio-Rad) and checked by Western blot analysis against various proteasome subunits, actin, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**Antigen processing activities.** Chymotryptic, tryptic, and caspase-like activities of proteasomes present in 3  $\mu\text{g}$  of cytosol were measured with specific fluorogenic substrates (1 mmol/L succinyl leucine-leucine-valine-tyrosine-7-amino-4-methylcoumarin (amc), 25  $\mu\text{mol/L}$  tert-butoxycarbonyl-leucine-arginine-amc, and 750  $\mu\text{mol/L}$  acetyl-tyrosine-alanine-valine-aspartic acid-amc, respectively; EMD Biosciences) [34, 36]. Aminopeptidase and tripeptidylpeptidase II activities required 50  $\mu\text{mol/L}$  leucine-amc or 100  $\mu\text{mol/L}$  alanine-alanine-phenylalanine-amc, respectively [34, 37]. The specificity of the reaction was checked by preincubation of extracts with inhibitors of proteasomes (MG-132; 10  $\mu\text{mol/L}$ ), aminopeptidases (bestatin; 120 mmol/L), or tripeptidylpeptidase II (butabindide; 330 nmol/L). After 1 h of incubation at 37°C, fluorescence emission was measured at 380/460 nm with use of a TKO fluorometer (Hoefer). Alternatively, fluorescence emission was recorded every 5 min for 1 h with use of a Victor3 plate reader (PerkinElmer).

**HIV epitope processing assay.** First, 8 nmol of peptides (Massachusetts General Hospital peptide core facility; >95% pure) were degraded with 40  $\mu\text{g}$  of cytosol, as described elsewhere [34]. Peptides present in the digestion mix at designated times were identified and quantified by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) [34]. The 4.6  $\times$  50  $\times$  3-mm C18 column (Waters) was calibrated with defined amounts of peptides covering the corresponding HIV sequence. The original undigested peptide and shorter peptides produced during in vitro digestion in cytosol form distinct peaks for which the areas under the curve are proportional to concentrations. The amount of peptides is calculated by integration of peaks. The identity of each peak is determined by comparing its elution time with that of known synthetic peptides covering the HIV sequence. The identity of peptides in the digestion mix was confirmed by mass spectrometry (Partners Proteomics).

**Antigenicity of degradation products.** Peptides present in the digestion mix were purified and diluted in Roswell Park Memorial Institute medium without serum, and pH was readjusted to 7.4. Chromium 51 (<sup>51</sup>Cr)-labeled HLA-matched B cells were pulsed with 0.07  $\mu\text{g/mL}$  digestion products without serum and were used as targets in killing assays with epitope-specific CTL clones, at a 4:1 ratio. The lysis percentages were compared with those of HLA-matched B cells pulsed with undigested long peptides, optimal epitopes, or extended peptides containing each epitope at concentrations ranging from 0 to 0.2  $\mu\text{g/mL}$  [34].

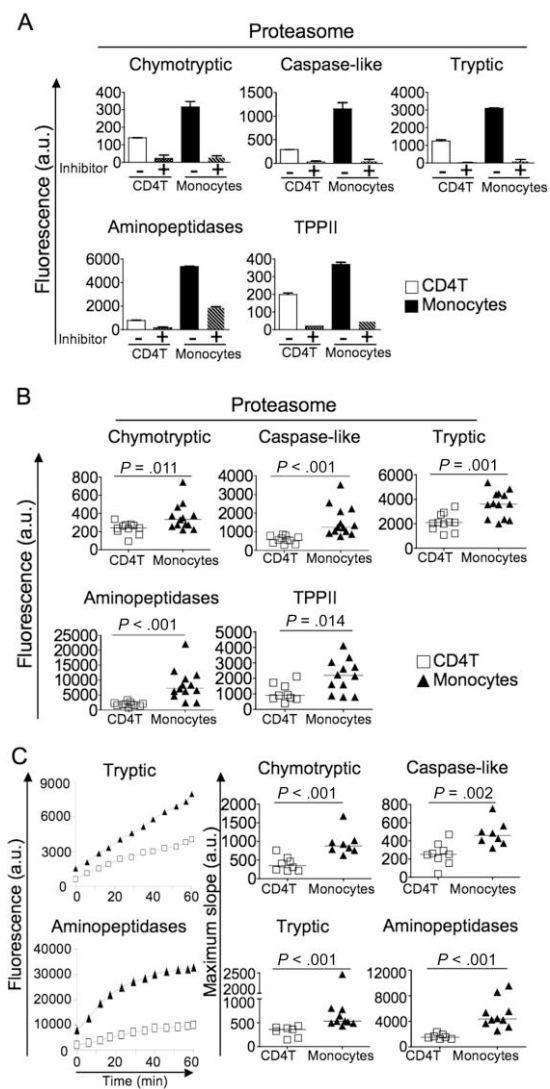
**Statistical analysis.** Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 5).

## RESULTS

**Antigen processing activities of CD4 T lymphocytes and monocytes.** To examine the relative antigen processing abilities of cell subsets, we measured the main proteolytic activities—chymotryptic, tryptic, and caspase-like activities of proteasomes (i.e., cleaving after hydrophobic, basic, and acidic amino acids, respectively)—and aminopeptidase and tripeptidylpeptidase II activities in primary CD4 T cells and monocytes sorted from freshly isolated PBMCs of HIV-uninfected donors. Each activity was measured with a fluorogenic substrate composed of a peptide specific for each proteolytic activity and a fluorogenic coumarin-derivative moiety [36]. Fluorescence is emitted on peptide hydrolysis in proportion to the activity level. Western blot analysis against actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in CD4 T cells and monocytes was used to control for the use of equal amounts of cytosol.

In a representative subject (figure 1A), proteasome, aminopeptidase, and tripeptidylpeptidase II activities were significantly higher in monocytes than in CD4 T cells. The specificity of these assays was confirmed by preincubation with specific inhibitors; proteasome, aminopeptidase, and tripeptidylpeptidase II activities were inhibited by >75% to 98% when extracts were preincubated with MG-132, bestatin, or butabindide, respectively. We then compared antigen processing activities of 14 healthy donors whose CD4 T cells and/or monocytes were sorted from PBMCs (figure 1B). Proteasome, aminopeptidase, and tripeptidylpeptidase II hydrolytic activities in extracts after 1 h of incubation were significantly higher in monocytes than in CD4 T cells for all donors (1.5-, 1.7-, and 2.7-fold higher for proteasome chymotryptic, tryptic, and caspase-like activities, respectively, and 4.4- and 2-fold higher for aminopeptidases and tripeptidylpeptidase II, respectively). PBMCs and CD4 T cells had similar antigen processing activities, except for aminopeptidases, which had extremely low activity in CD4 T cells (0.4-fold difference between CD4 T cells and PBMCs; unpublished observations). In 7 donors, antigen processing activities were measured again 2–6 months later. Despite an intradonor variability of 5%–20% for some activities in each subset, proteasome and aminopeptidase activities were consistently significantly higher in monocytes, with a mean fold difference between activities for monocytes and CD4 T cells within 85%–99.6% of those at the first time point (unpublished observations).

We next determined whether steady-state differences in hydrolytic activities between monocytes and CD4 T cells reflected differences in the kinetics of substrate degradation. Hydrolytic activities were measured with specific substrates for 1 h, and maximum slopes were calculated (figure 1C). The kinetics of substrate hydrolysis for proteasome and aminopeptidase activities were fastest in monocytes. Maximum slopes for chymotryptic, caspase-like, and tryptic degradation were 1.9-, 2.4-,



**Figure 1.** Monocytes have higher antigen processing activities than do CD4 T cells. *A*, Antigen processing activities of 1 representative donor. Proteasome (chymotryptic, caspase-like, and tryptic activities), aminopeptidase, and tripeptidylpeptidase II activities were measured in duplicate with specific fluorogenic substrates in extracts from CD4 T lymphocytes and monocytes immunosorted from peripheral blood mononuclear cells in the absence (plain bars) or presence (striped bars) of specific peptidase inhibitors. Data indicate means of 2 measurements with standard deviations. *B*, Proteasome, aminopeptidase, and tripeptidylpeptidase II activities were measured in triplicate in CD4 T cells (squares) and monocytes (triangles) from 14 healthy donors. *C*, Hydrolysis of fluorogenic substrates specific for proteasome tryptic and aminopeptidase was measured during 1 h. Left panels show results in 1 representative donor. Middle and right panels show maximum slopes of hydrolysis kinetics of chymotryptic, tryptic, and caspase-like proteasome and aminopeptidase activities, measured in triplicate, and calculated in CD4 T cells and monocytes from 13 healthy donors. *B* and *C*, Each point is the mean of triplicate measurements in 1 donor. Horizontal lines represent median values of all donors. Differences between monocytes and CD4 T cells were statistically significant, even without the donor with unusually high tryptic activity (nonparametric Mann-Whitney test); paired Wilcoxon test, performed in 9–11 samples, also showed significant differences. a.u., Arbitrary units.

and 2.4-fold higher, respectively, in monocytes than in CD4 T lymphocytes, and slopes for aminopeptidase degradation were 3.2-fold higher for monocytes. These results indicate significantly higher proteolytic activities in monocytes than in CD4 T cells.

**Antigen processing activities in CD4 T lymphocytes and monocytes and the production of HIV epitopes.** The hydrolysis of fluorogenic peptide substrates demonstrated differences in the proteolytic potential of CD4 T lymphocytes and monocytes but did not provide information about their impact on epitope processing. We have developed an in vitro degradation assay of polypeptides that recapitulates the complete endogenous processing and presentation of epitopes derived from endogenous proteins [34]. This assay enables us to identify the degradation products by mass spectrometry, to quantify them by RP-HPLC profile analysis, and to measure the ability of the peptides produced to sensitize cells for lysis by CTLs (figure 2A). Using this assay, we showed elsewhere that the in vitro processing of HIV-1 Gag p17 fragments in PBMC cytosol yielded peptides with antigenicity comparable to that of HLA-A3 cells endogenously expressing Gag p17 and processing and presenting epitopes [34].

Initially, we examined the processing of an HIV Gag p17 peptide fragment (RWEKIRLRPGGKKKYKL aa 15–31), shown elsewhere to contain 3 HLA-A3–restricted CTL epitopes (KK9, aa 18–26, KIRLPPGGK; RK9, aa 20–28, RLRPGGKKK; and RY10, aa 20–29, RLRPGGKKKY) targeted in acute infection [8]. The complete processing of these epitopes is performed by proteasomes, tripeptidylpeptidase II, and aminopeptidases in the cytosol [34], and it is endoplasmic reticulum (ER) aminopeptidase associated with antigen processing (ERAAP)/ER aminopeptidase 1 (ERAP1) independent, because ERAAP/ERAP1 cannot cleave peptides rich in charged residues [38]. Equal amounts of cytosol from CD4 T cells or monocytes were used for degradation. Peptides produced during degradation were identified by mass spectrometry (figure 2B) and were quantified by RP-HPLC profile analysis (figure 2C). After 2 min, most fragments produced in extracts from the 2 subsets were identical, but 60-min incubation resulted in major differences in the fragments produced by these subsets. Extracts from CD4 T cells yielded longer p17 fragments (8–16 mer), whereas peptides produced in monocyte extracts yielded shorter peptides compatible with MHC-I loading (8–11 mer) [39]. They included 4 known overlapping optimal HIV epitopes: HLA-A3–restricted KK9, RK9, and RY10 and HLA-B27–restricted IK9 (IRLPPGGKK) [40]. The 4 remaining peptides generated by monocyte extracts were optimal epitopes with a 1- or 2-residue extension [34]. Of interest, although this p17 fragment contains 8 known epitopes [40], only the 3 HLA-A3–restricted optimal epitopes presented during acute HIV infection (with RK9 and RY10 being codominant in HLA-A3-positive persons [8]) were



**Figure 2.** Monocytes quickly produce short peptides fitted for loading onto major histocompatibility complex class I. *A*, Use of the in vitro degradation assay of polypeptides to identify the degradation products by mass spectrometry. *B*, A p17 17-mer peptide (aa 15–31) containing 4 optimal human immunodeficiency virus (HIV) epitopes (upper boxed sequence) was degraded in equal amounts of extracts from CD4 T cells (white) and monocytes (black) from the same donor. Peptides (bars) were identified by mass spectrometry. Optimal epitopes detected in the degradation products are HLA-A3–restricted KK9 (circles), RK9 (open stars), and RY10 (black stars), and HLA-B27–restricted IK9 (diamonds). *C*, The degradation of the p17 17-mer peptide was performed in extracts from CD4 T cells (white bars) or monocytes (black bars). The peptides (names based on amino acid extension around optimal RK9) produced after incubations of 2, 10, and 60 min were identified and quantified by high-pressure liquid chromatography profile analysis. Results are representative of 3 healthy donors. *D*, Reverse-transcriptase 17-mer peptide (aa 152–169) containing 2 optimal HIV epitopes (upper boxed sequence) was degraded in equal amounts of extracts from CD4 T cells (white) and monocytes (black) from the same donor. Each peptide (bar) was identified by mass spectrometry. The optimal epitope detected in the degradation products is HLA-A3/11–restricted ATK9 (black pentagon). Results are representative of 3 donors.

produced using extracts from CD4 T cells and monocytes. Similar results were obtained with extracts from 3 healthy donors. This indicates that the previously defined link between the efficiency of HIV epitope processing and the frequency of early CTL responses during HIV infection in PBMCs [34] also applies to 2 main subsets targeted by HIV but that the cytosol from these subsets differs with regard to the kinetics and quantity of peptide produced: the CD4 T cell antigen processing machinery yielded only 2 optimal epitopes (HLA-A3 RK9 and RY10) and many longer fragments.

To investigate these apparent differences further, we quantified the peptides produced by each of the extracts with use of RP-HPLC profile analysis (figure 2C). The column was calibrated using defined amounts of peptides included in the polypeptide, and degradation products were identified and quantified over time. Each peptide was defined according to its elution time and was quantified by calculating the area under the peak, which is proportional to the amount of peptides. For these studies, we made use of peptides for which we had precisely defined degradation products [34]. The degradation of 5-RK9-3 (nomenclature based on the length of N- and C-terminal extensions around the optimal HLA-A3-restricted CTL epitope RK9) into 5-RK9-2 is performed by proteasomes [34] and was faster in monocyte extracts than in those generated from CD4 T cells. This result is in agreement with the higher proteasome activities detected in monocytes (figure 1). In accordance with mass spectrometric analyses (figure 2B), this 16-mer peptide persisted in extracts from CD4 T cells (1.28 nmol remained after 60 min), whereas in monocyte extracts, it was fully degraded into smaller fragments in <30 min. The production of epitopes RK9 and RY10 was also substantially faster and greater in monocyte extracts than in CD4 T cell extracts (yield, 3.5- and 2.5-fold higher in monocytes, respectively). In contrast, longer fragments such as 5-RK9-2 and 5-RK9-1, which are less likely to bind optimally to MHC-I, constituted the bulk of peptides produced by CD4 T cell extracts after 1 h. Similar results were obtained with 3 donors.

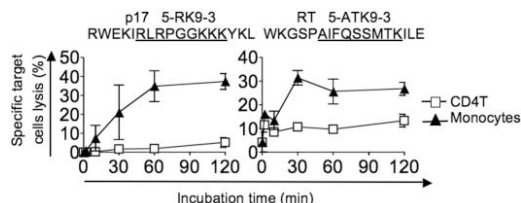
We performed a similar study with use of a fragment from HIV-1 reverse transcriptase (WKGSPAIFQSSMTKILE, aa 152–169, containing HLA-A3/11-restricted ATK9 epitope) (figure 2D). Consistent with our studies with the Gag peptide, the reverse transcriptase peptide was degraded more quickly by monocytes than by CD4 T cell extracts. Optimal epitope ATK9 and peptides with an N-extension of 1–3 residues (10–12 mer) were produced exclusively in monocyte cytosol, whereas peptides produced in CD4 T cell cytosol were mostly either longer (14 or 15 mer) or did not contain the complete epitope (figure 2D). These results demonstrate that the antigen processing machinery of monocytes rapidly degrades long peptides and is likely to be more efficient at generating more epitopes of length compatible with MHC-I binding.

### Antigen processing activities in CD4 T lymphocytes and monocytes and the antigenicity of HIV peptides.

We examined whether differences in antigen processing would affect the generation of peptides with the ability to sensitize cells for lysis by the cognate CTLs, by comparing the antigenicity of degradation products yielded by CD4 T cells and monocyte extracts. To enable strict comparison of antigenicity independent of potential variations in surface markers expressed by cells, equal amounts of HIV peptide degradation products produced in subset extracts were pulsed onto an HLA-matched B cell line used as a target in a  $^{51}\text{Cr}$  killing assay with an epitope-specific clone (figure 3). Degradation products of the p17 fragment (5-RK9-3) yielded an increasing CTL response over time, as expected for increasing production of shorter peptides containing RK9 (similar results were obtained with 2 different RK9-specific CTL clones). Peptides generated in monocyte extracts had the highest antigenicity, with a plateau of 37% lysis of target cells reached after 1 h. In contrast, degradation products of the p17 fragment yielded in CD4 T cell extracts never reached >5% lysis, in keeping with the qualitative and quantitative identification of long peptides with poor binding capacity to HLA-A3 (figure 2B, C).

By comparing the lysis of B cell lines pulsed with degradation products with that of B cell lines pulsed with increasing amounts of optimal peptide RK9, we estimate that the antigenic RK9 equivalent produced in extracts from CD4 T cells and monocytes at 60 min is 0.07 and 25 nmol/L RK9, respectively, corresponding to a 357-fold increased antigenicity of peptides produced by the antigen processing machinery of monocytes, compared with CD4 T lymphocytes.

Similarly, we compared the antigenicity of peptides obtained during the degradation of 5-ATK9-3 from HIV-1 reverse transcriptase (figure 3). The degradation of 5-ATK9-3 in monocyte



**Figure 3.** The antigen processing machinery of monocytes produces more antigenic peptides than does that of CD4 T lymphocytes. Long human immunodeficiency virus (HIV) peptides named 5-RK9-3 (aa 15–31 in Gag p17) (*left panel*) and 5-ATK9-3 (aa 152–169 in Pol RT) (*right panel*) were degraded in extracts from CD4 T cells (*squares*) or monocytes (*triangles*) for 2 h. Aliquots of degradation products taken at various time points were purified and used to pulse HLA-matched B cells. Cytotoxic T lymphocyte responses against HLA-A3 RK9 (p17) and HLA-A3/11 ATK9 (RT) were assessed by chromium 51 release assay. Degradation experiments were performed in extracts from 3 donors, and killing assays were performed in triplicate. Results represent mean values and error bars for 3 donors.

extracts yielded antigenic peptides, with an ATK9-specific CTL lysis of 26% reached after 60 min of degradation. In contrast, the antigenicity of degradation products from CD4 T cells never exceeded 13%, in accordance with the detection of optimal or shortly extended ATK9 peptides by mass spectrometry in figure 2D. The antigenic ATK9 equivalent of degradation products corresponds to 0.05 and 1 nmol/L ATK9 for monocytes and CD4 T cells, respectively—a 20-fold increased antigenicity of peptides processed by the monocyte processing machinery, compared with that of CD4 T cells. These results show that the degradation of various HIV peptides in monocyte extracts was faster and yielded shorter peptides with higher antigenicity.

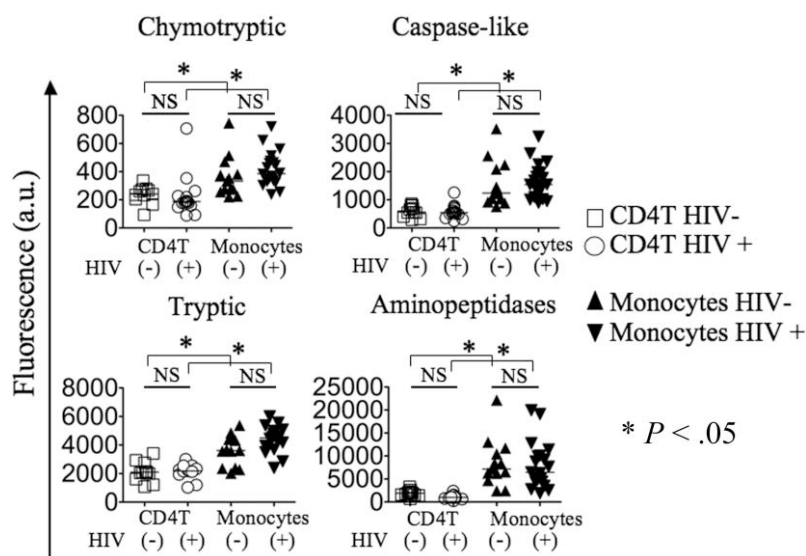
**Antigen processing activities in monocytes of HIV-infected persons.** Because Tat transactivating protein expression affects proteasome activities in cell lines [41], we examined whether antigen processing activities of HIV-infected persons may be altered. We measured proteasome and aminopeptidase activities in CD4 T cells and monocytes from 18 persons chronically infected with HIV and compared them with findings in healthy donors (figure 4). Monocytes from HIV-infected donors have higher antigen processing activities than do fresh CD4 T lymphocytes, in proportions similar to those found in healthy donors. For each subset, we observed no significant differences between infected and healthy donors. However, the low per-

centage of circulating HIV-infected cells in chronic infection may mask any potential impact of HIV infection on antigen processing activities. The heterogeneity of the population of infected persons requires a larger study.

## DISCUSSION

The capacity of cellular subsets to process and present endogenous antigens is likely to have a critical impact on the ability of CTLs to kill pathogen-infected cells. This study focused on 2 subsets targeted by HIV: CD4 T lymphocytes and monocytes. We demonstrate that several HIV peptides produced by the monocyte antigen processing machinery have more rapid kinetics, higher quantities, and increased antigenicity, compared with those produced by CD4 T lymphocytes.

Differences in epitope processing and antigenicity between the 2 cell subsets will probably vary according to the peptidases involved in the processing of each epitope and the viral polypeptide being degraded. The greatest differences between monocytes and CD4 T cells were observed for aminopeptidase activities. Thus, epitopes requiring aminopeptidase trimming may be poorly presented by CD4 T cells, whereas epitopes requiring mainly chymotryptic proteasome trimming would be less affected by the cell subset from which they originate. Be-



**Figure 4.** Monocytes of both healthy and human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals have higher antigen processing activities than do CD4 T cells. Proteasome (chymotryptic, caspase-like, and tryptic activities) and aminopeptidase activities were measured in triplicate in CD4 T cells and monocytes from 14 healthy donors (squares and circles represent CD4 T cells, and triangles represent monocytes) and 18–20 chronically HIV-infected donors (circles represent CD4 T cells, and inverted triangles represent monocytes). The mean viral load in HIV-infected persons was 62,966 RNA copies/mL (range, <50–750,000 copies/mL). The mean CD4 T cell count in HIV-infected donors was 514 cells/mL blood (range, 19–1198 cells/mL). The HIV-infected donors included 8–9 persons receiving antiretroviral therapy and 10–12 not receiving treatment, with no substantial difference in antigen processing activities according to treatment status. Horizontal lines represent median values. In HIV-infected persons, chymotryptic, caspase-like, and tryptic proteasome activities were 1.9-, 2.9-, and 2.1-fold higher in monocytes than in CD4 T cells, and aminopeptidase activities were 3-fold higher. Differences between monocytes and CD4 T cells were statistically significant for each category of donors, but differences between healthy and HIV-infected donors were not significant (NS) for a given subset (Kruskal-Wallis test with Dunn's comparison). a.u., Arbitrary units

cause aminopeptidases are the main postproteasomal peptidases involved in antigen processing [23, 25, 28, 42], our data suggest that the landscape of epitopes presented by CD4 T cells may be significantly different from that presented by monocytes. This difference may be further increased by additional processing pathways specific to monocytes, involving endosomal and/or lysosomal degradation of exogenous antigens [43]. Studies of the processing of additional HIV epitopes in these subsets are needed to extend this observation.

The differences in lengths and amounts of peptides produced by each subset may affect the binding capacity to MHC-I and TCR. The binding affinity of peptides to MHC-I [6] and the longevity of surface display of peptide-MHC complexes, which depends partly on TCR specificity and avidity [2–6], will affect the presentation of epitopes. High-affinity MHC-I–epitope complexes may continue to function despite lower epitope availability. It is likely that differences in the antigenicity of degradation products between monocytes and CD4 T cells and subsequent killing by CTLs will become more apparent for epitopes displaying lower affinity for MHC-I and for CTLs with lower functional avidity. Furthermore, if CD4 T cells are less efficiently recognized by some CTLs because of suboptimal epitope production, it may provide them with a survival advantage and a higher probability of establishing viral reservoirs [14–17].

The cell populations examined here can be explored in additional detail. Monocytes are composed of several subpopulations [44], including >80% of CD14<sup>+</sup> cells and a subpopulation of CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes that are more permissive to HIV infection [18]. Whether these monocyte subsets display different processing activities is unknown. Because CD16<sup>+</sup> monocytes represent <10% of the monocyte population, it is unlikely that they would be solely responsible for the higher activities that we measured for the total monocyte population. Similarly, the antigen processing activities of naive, effector, and memory CD4 T cells, macrophages, and DCs need to be investigated further, as do potential differences in costimulatory molecules among subsets. These results, however, are among the first to highlight the functional relevance of differences in antigen processing activities between cell types, which may help explain HIV pathogenesis. The priming of naive CD8 T cells is performed by DCs displaying endogenously processed HIV epitopes. If CD4 T cells and monocytes process and present different peptides or different amounts of peptides than those displayed during priming, recognition, and clearance of infected subsets, the killing of infected subsets by CTLs may be affected.

The potential impact of HIV-induced cellular activation on antigen processing activities should also be considered. Because activated CD4 T cells most likely to be infected by HIV, we measured proteasome activities in phytohemagglutinin-acti-

vated CD4 T cells and monocytes. Phytohemagglutinin-activated subsets have significantly higher chymotryptic, caspase-like, and tryptic proteasome activities than do their fresh counterparts (1.1-, 1.4-, and 1.2-fold higher, respectively, for CD4 T cells and 1.4-, 2.7-, and 1.1-fold higher, respectively, for monocytes), which resulted in faster degradation of the p17 fragment (unpublished observations). Nevertheless even phytohemagglutinin-activated CD4 T cells possess antigen processing activities 2–5-fold lower than those of monocytes, suggesting that CD4 T cells, regardless of their activation state, are not the subset most efficient at producing the epitopes tested here. Together, these data indicate that the specificity of epitope processing and presentation should be carefully analyzed during vaccine development not only in pathogen-infectable cells but also in cells targeted by vaccines, because vaccine-induced CTLs should recognize epitopes processed by infected cell subsets.

## Acknowledgments

We thank Dr. K. Parker, for help with the mass spectrometry analysis; Dr. Kaufmann, for help with the fluorescence-activated cell sorter analysis of subsets of peripheral blood mononuclear cells; K. Moss, for collecting blood samples; and Drs. R. Siliciano, M. Brockman, Z. Brumme, D. Kaufmann, and D. Kavanagh, for stimulating discussions and critical reading of the manuscript.

## References

1. Yang OO, Kalams SA, Trocha A, et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8<sup>+</sup> cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol* **1997**; 71:3120–8.
2. Kageyama S, Tsomides TJ, Sykulev Y, Eisen HN. Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol* **1995**; 154:567–76.
3. Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* **1991**; 352:67–70.
4. Reay PA, Matsui K, Haase K, Wulfig C, Chien YH, Davis MM. Determination of the relationship between T cell responsiveness and the number of MHC-peptide complexes using specific monoclonal antibodies. *J Immunol* **2000**; 164:5626–34.
5. Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* **1996**; 4:565–71.
6. Krogsgaard M, Davis MM. How T cells “see” antigen. *Nat Immunol* **2005**; 6:239–45.
7. Addo MM, Yu XG, Rathod A, et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **2003**; 77:2081–92.
8. Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, et al. HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial CD8(+) T cell response against HIV-1. *PLoS Med* **2006**; 3:e403.
9. Frahm N, Linde C, Brander C. Identification of HIV-derived, HLA class I restricted CTL epitopes: insights into TCR repertoire, CTL escape and viral fitness. In: Korber BT, Brander C, Haynes BF, et al., eds. *HIV molecular immunology 2006/2007*. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, **2007**.

10. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. CD8<sup>+</sup> T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* **2007**; 13:46–53.
11. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, et al. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* **2001**; 75:11983–91.
12. Cao J, McNeven J, Holte S, Fink L, Corey L, McElrath MJ. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-secreting CD8<sup>+</sup> T cells in primary HIV-1 infection. *J Virol* **2003**; 77:6867–78.
13. Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8<sup>+</sup>-T-cell responses to the Gag protein of HIV-1 correlates inversely with viral load in plasma. *J Virol* **2002**; 76:2298–305.
14. Eckstein DA, Penn ML, Korin YD, et al. HIV-1 actively replicates in naive CD4<sup>+</sup> T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity* **2001**; 15:671–82.
15. Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **1997**; 387:183–8.
16. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94:13193–7.
17. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* **2002**; 417:95–8.
18. Ellery PJ, Tippet E, Chiu YL, et al. The CD16<sup>+</sup> monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol* **2007**; 178:6581–9.
19. Zhu T, Muthui D, Holte S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14<sup>+</sup> monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **2002**; 76:707–16.
20. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* **1986**; 233:1089–93.
21. Keele BF, Tazi L, Gartner S, et al. Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **2008**; 82:5548–61.
22. Goldberg A, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* **2002**; 39:147–64.
23. Saric T, Chang SC, Hattori A, et al. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* **2002**; 3:1169–76.
24. Serwold T, Gaw S, Shastri N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat Immunol* **2001**; 2:644–51.
25. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **2002**; 419:480–3.
26. Lopez D, Gil-Torregrosa BC, Bergman C, Del Val M. Sequential cleavage by metallopeptidases and proteasomes is involved in processing HIV-1 ENV epitope for endogenous MHC class I antigen presentation. *J Immunol* **2000**; 164:5070–7.
27. Seifer U, Maranon C, Shmueli A, et al. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* **2003**; 4:375–9.
28. Wherry EJ, Golovina TN, Morrison SE, et al. Re-evaluating the generation of a “proteasome-independent” MHC class I-restricted CD8 T cell epitope. *J Immunol* **2006**; 176:2249–61.
29. Butz EA, Bevan MJ. Differential presentation of the same MHC class I epitopes by fibroblasts and dendritic cells. *J Immunol* **1998**; 160:2139–44.
30. Crowe SR, Turner SJ, Miller SC, et al. Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8<sup>+</sup> T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J Exp Med* **2003**; 198:399–410.
31. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **2005**; 307:1630–4.
32. Ossendorp F, Fu N, Camps M, et al. Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *J Immunol* **2005**; 174:7815–22.
33. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* **2000**; 303:643–53.
34. Le Gall S, Stamegna P, Walker BD. Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* **2007**; 117:3563–75.
35. Le Gall S, Neuhoef A, Rapoport TA. The ER membrane is permeable to small molecules. *Mol Biol Cell* **2004**; 15:447–55.
36. Kisselev AF, Goldberg AL. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* **2005**; 398:364–78.
37. Beninga J, Rock KL, Goldberg A. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* **1998**; 273:18734–42.
38. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**; 102:17107–12.
39. Sette A, Sidney J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* **1999**; 50:201–12.
40. Korber BT, Brander C, Haynes BF, et al, eds. HIV molecular immunology 2008. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, **2008**.
41. Gavioli R, Gallerani E, Fortini C, et al. HIV-1 tat protein modulates the generation of cytotoxic T cell epitopes by modifying proteasome composition and enzymatic activity. *J Immunol* **2004**; 173:3838–43.
42. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* **2005**; 6:689–97.
43. Noursadeghi M, Katz DR, Miller RF. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect Dis* **2006**; 6:794–804.
44. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* **2001**; 69:11–20.

## **IMPACT DU SOUS-TYPE VIRAL ET DE L'APPRÊTEMENT ANTIGENIQUE SUR LA PRESENTATION DES EPITOPES DU VIH-1 PAR LES MOLECULES HLA DE CLASSE I**

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) dirigés contre le VIH jouent un rôle essentiel dans la défense anti-virale. L'identification des facteurs impliqués dans la variabilité de ces réponses est indispensable à la mise au point de vaccins efficaces.

Nous avons focalisé notre travail sur deux facteurs potentiellement impliqués dans la reconnaissance du virus par le HLA : le sous-type viral et la qualité de l'apprêtement antigénique.

L'extrême variabilité du virus avec à ce jour 11 sous-types et 48 formes recombinantes (CRFs) circulant au sein de populations au typage HLA hétérogène implique un polymorphisme important avec des mutations d'échappement multiples.

Nos résultats montrent que dans la population Vietnamiennne infectée par le VIH, le CRF01\_AE prédomine largement et que l'affinité pour la molécule HLA des épitopes CTL classiquement décrits dans les sous-types B est drastiquement diminuée, ce qui favorise l'échappement de ce sous-type viral au système immunitaire.

Par ailleurs, nous avons montré que l'apprêtement des épitopes CTL dépend du type de cellule impliquée, les monocytes se caractérisant par une capacité de présentation significativement plus forte à l'origine d'une réponse CTL plus efficace comparativement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Des tests de dégradation *in vitro* ont démontré que la stabilité intracellulaire des épitopes est hautement variable, dépendante de la séquence en acides aminés et contribue à l'optimisation de la réponse CTL.

L'ensemble de ces résultats indiquent que, au delà de l'affinité pour le HLA ou le TCR et des facteurs d'épuisement cellulaire, la réponse CTL peut aussi être modulée par le sous-type viral et l'apprêtement antigénique.

**Mots Clés :** HIV-1, polymorphisme viral, apprêtement antigénique, CTL, HLA de classe I

## **IMPACT OF HIV-1 SUB-TYPE AND ANTIGEN PROCESSING ON HLA CLASS I RECOGNITION**

HIV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) play a critical role for clearance of virus-infected cells and induction of these cells is a necessary component of any successful vaccine strategy against AIDS. Therefore, identification of the factors defining and modulating the efficiency of these protective responses are urgently needed.

We focused our study on two factors potentially involved in HLA recognition: HIV-1 sub-type and antigen processing.

The extreme variability of the virus with to date 11 HIV-1 subtypes and 48 circulating recombinant forms (CRFs) circulating worldwide among heterogeneous populations imply high polymorphism and different mutational escape patterns.

We demonstrate that among the HIV-1 infected Vietnamese population where the CRF01\_AE is largely predominant, the HLA binding of known CTL epitopes is strongly reduced compared to the subtype B due to intraepitopic mutations, facilitating immune evasion of these viral strains.

Moreover, we show that the presentation of adequate amounts of epitopes leading to CTL recognition depends on the subset cells involved in the antigen processing, monocytes having a significantly higher and more efficient proteolytic activity. Using *in vitro* degradation assays, we measured the intracellular HIV-1 epitope stability and demonstrated that this factor is highly variable, sequence dependent and also contributes to a more efficient presentation.

Together, these data indicate that, besides HLA and TCR binding and exhaustion factors, HIV-1 CTL recognition can also be modulated by the viral sub-type and the antigen processing machinery.

**Key Words :** HIV-1, viral polymorphism, antigen processing, CTL, HLA class I

### **Laboratoires d'accueil :**

Laboratoire de virologie (EA 2968), Université Victor Segalen Bordeaux 2, France

Ragon Institute du Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston (USA)