# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

**UMR_S INSERM/UdS U748**

# THÈSE présentée par :

**Alexandre LEDERLE**

soutenue le : **25 juin 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspect Cellulaire et Moléculaire de la Biologie

# Infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes par le VIH : Mécanisme d'inhibition par les anticorps et étude des modifications fonctionnelles

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **Mme MOOG Christiane** | Directeur de Recherche, Université de Strasbourg |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **M. HERBEUVAL Jean-Philippe** | Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Paris |
| **Mme SCARLATTI Gabriella** | Directeur de Recherche, DIBIT, Milan |

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

| | |
|---|---|
| **M. BAHRAM Seiamak** | Professeur, Université de Strasbourg |
| **M. HOLL Vincent** | PhD, COVANCE, Genève |

«Celui qui apprend quelque chose de moi enrichit son savoir sans réduire le mien, tout comme celui qui allume sa chandelle à la mienne se donne de la lumière sans me plonger dans l'obscurité.»

Thomas Jefferson

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury de thèse Jean-Philippe Herbeuval, Gabriella Scarlatti, Seiamak Bahram et Vincent Holl d'avoir accepter d'évaluer mon travail.

Ces remerciements sont l'occasion de saluer tous les membres de l'Institut de Virologie et de l'unité INSERM U748, pour tout ce qu'ils m'ont apporté depuis mon arrivée au laboratoire en septembre 2007 lors de ma deuxième année de Master, jusqu'à la fin de ma thèse en 2012.

Arrivé au labo, c'est pas tout de suite facile de s'intégrer, mais je suis pas seul, Céline travaille également à l'Institut. Les premiers mois sont consacrés à la bibliographie et à l'observation ; Maryse me fait entretenir une lignée cellulaire : faut que ça reste « propre ». Au second semestre, c'est parti pour les « manips » ! Le 25 janvier 2008, Thomas D me montre le « buffy » (ah ! des vampires !), et j'ai droit au donneur $O^+$ n°629. Evidemment ça n'a pas raté, enfin … si, la « centri » a le frein à fond et tout est mélangé : il n'y a rien à faire. Pas le temps de rêvasser, j'enchaîne et Vincent me montre la purification des pDC, la cytométrie, la neutral'. VIH oblige, tout se déroule dans le « P3 » : faut être prudent. Sylvie, Géraldine et les autres m'aident à me rappeler de toutes les consignes : inscription dans le carnet…OK, blouse…OK, masque…OK, lunettes…OK, double gants…OK, surchausses…OK, surblouse…OK, et au boulot ! Une fois sorti, tout c'est bien passé : « ben non, t'as oublié de t'inscrire en sortant », zut ! (note pour le lecteur, zut n'est pas un mot que j'emploie, dans aucun contexte). Quelques semaines plus tard, un nouveau arrive, enfin nouveau, c'est vite dit, je le connais depuis la maternelle : Julien a.k.a. le petit. Je lui montre comment, au laboratoire, nous faisons le Ficoll, alors que j'en avais fait moins de dix : la bonne blague. Bref, ça démarre sur les chapeaux de roues, et le rythme n'a jamais faibli (« c'est ça ! Style tu fais semblant de travailler ! pff !»). Pour relâcher la pression on écoute Christian s'énerver contre son ordinateur qui ne veut pas imprimer, mais inexorablement la pression revient … principalement par dose de 50 cL et dans des coloris blonds, bruns, ambrés, etc. Ça commence doucement (Olivier, Christian, Thomas C, Thomas D, Valentin, Dominique L, Julien) et très vite la moitié de l'institut est là (oui, ça balance), Joachim envoie la tournée de Jägermeister (on peut citer des marques, hein ?). Ah, qu'est-ce qu'on a pu rigoler ! Enfin, j'ai moins ri quand les « congélos » sont tombés comme des mouches (des grosses mouches) ou que le P3 était inondé, ou sous 40°C, ou sans pression. Parfois certains perdent les données du cytomètre qui « disparaissent » et s'effacent « toutes seules » (par pure amitié, je tairai le nom de cette personne). Je noirci sans doute le tableau car le soutien logistique a toujours été présent, et sans eux, j'aurais assurément eu plus de mal à avancer : merci à Sigis, Dominique L, Anne, Joëlle, Richard et Jérémie.

L'inévitable pause méridienne (non, pas à Greenwich) aura également laissé des souvenirs impérissable (pas comme les yaourts de Marine) : Valentin qui nous raconte les blagues de l'Internet, qui balance vanne sur vanne, et qui nous fait profiter de ses déboires quotidiens ; les « Morteau-Mont d'Or » de Thomas C ; Laurent et Eric qui ne sont pas en reste pour les vannes bien placées ; Rémy qui déguste un succulent sandwich pâté-beurre (miam !) alors que Sarah et Laura subissent vanne sur vanne et mangent les plats qu'elles se sont préparés. Les mots fléchés pour Mirjam, Isabelle, Marine, Laetitia. Puis le café, la clope pour certain(e)s, et encore la rigolade (très souvent au détriment de Céline), avant de retourner travailler, et hop … cinq années ont défilées.

J'ai eu la chance de travailler dans de très bonnes conditions. J'ai eu l'insolente chance de participer à de nombreux congrès qui ont générés leurs lots de souvenirs : les cyclones et les cocktails de Malte (merci Raphaëlle), les prières dans les temples de Bangkok (merci Bernard), les bières d'1 L à Lisbonne commandée par Marina complètement à l'aise avec la langue lusitanienne, et l'extravagance de Bin ainsi que sa manie de tout prendre en photos.

La vie d'un laboratoire est aussi faite de gens qui arrivent et de gens qui partent. Liliane, j'ai bien fait attention à ne pas mettre les stylos dans ma bouche. Anne-Marie, merci pour votre soutien pour le Master 2. Merci à Alvaro, notamment pour la visite de l'étage technique. Merci Rosalba pour votre aide et votre gentillesse. Andrew, I really liked to talk about science and research with you.

Plus sérieusement, je remercie ma directrice de thèse, Christiane Moog, de m'avoir fait confiance tout au long de ces cinq années. Je remercie également Vincent Holl de m'avoir montré les « ficelles » quand je débutais. Je vous remercie tous les deux pour votre soutien. Vous m'avez beaucoup appris sur le fonctionnement d'un laboratoire et vous avez éclairé ma vision de la recherche et du chercheur.

Je remercie tous mes amis « scientifiques » et « non-scientifiques » pour tous les moments que nous avons partagés, pour m'avoir écouté radoter à propos du travail, pour avoir ri poliment à mes blagues, et surtout pour m'avoir fait rire.

Enfin, je remercie ma mère qui me disait étant petit : « Ne fais pas comme moi. Travailles à l'école, comme ça, plus tard, tu auras un « vrai » métier. ». Alors j'ai travaillé, et je suis là, à faire le travail que j'ai toujours voulu faire. C'est grâce à elle. Elle s'est battue toute sa vie pour que je puisse aller au bout. Il me reste encore du chemin à parcourir, mais peu importe ce que l'avenir me réserve, je n'oublierai jamais d'où je viens. Merci.

# Table des matières

Remerciements ..... ii

Introduction ..... 1

Chapitre 1 Le Virus de l'Immunodéficience Humaine ..... 2

1 Un virus dans le monde ..... 2

2 … Un virus dans le corps ..... 4

2.1 Structure de la particule virale du VIH-1 ..... 4

2.2 Génome du VIH-1 ..... 5

2.3 Cycle réplicatif du VIH-1 ..... 6

2.3.1 Étape précoce. De l'entrée du virus à l'intégration de son génome ..... 7

2.3.2 Étape tardive. De l'expression du génome au bourgeonnement du virus. ..... 8

2.4 La physiopathologie du VIH ..... 9

2.4.1 Transmission du VIH et phase aigüe ..... 10

2.4.2 Phase asymptomatique et phase SIDA ..... 13

2.4.3 Cas particuliers de l'évolution de la maladie ..... 16

2.4.3.1 Polymorphisme du CCR5 ..... 16

2.4.3.2 Ligand des corécepteurs ..... 16

2.4.3.3 Polymorphisme des gènes HLA ..... 17

2.4.3.4 Facteurs de restriction cellulaire ..... 17

Chapitre 2 La neutralisation du VIH-1 ..... 19

1 Mécanismes d'action des anticorps ..... 19

1.1 La neutralisation ..... 20

1.2 Le système du complément ..... 20

1.3 Mécanismes liés aux récepteurs Fc des immunoglobulines G ..... 21

1.3.1 Inhibition dépendante des RFc ..... 21
1.3.2 L'ADCC ..... 22
1.3.3 L'ADCVI ..... 22
2 La réponse humorale dans l'infection par le VIH-1 ..... 22
3 Les anticorps neutralisants *in vitro* ..... 23
3.1 Structure de l'enveloppe ..... 23
3.1.1 La gp120 ..... 23
3.1.2 La gp41 ..... 25
3.2 Anticorps dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 ..... 26
4 Transfert passif d'anticorps *in vivo* dans les modèles de primates non-humain ..... 30
5 Rechercher un vaccin ..... 31
5.1 Les essais vaccinaux ..... 32
5.2 Les stratégies futures ..... 33
Chapitre 3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ..... 35
1 Les cellules dendritiques ..... 35
2 Les cellules dendritiques et la transmission du VIH-1 ..... 36
2.1 Le transfert en *trans* ..... 36
2.2 Le transfert en *cis* ..... 37
3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ..... 39
3.1 La découverte des pDC ..... 39
3.2 Le phénotype des pDC ..... 39
3.3 Le développement des pDC ..... 40
3.4 Localisation et circulation des pDC ..... 40
3.5 Les fonctions des pDC ..... 41
3.5.1 La sécrétion de cytokines, en particulier les IFN de type I ..... 41

3.5.2 La présentation antigénique ..... 44
4 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et le VIH-1 ..... 46
4.1 L'infection par le VIH-1 affecte la population de pDC ..... 46
4.1.1 Au niveau du sang ..... 46
4.1.2 Au niveau des organes lymphoïdes ..... 47
4.2 Effet du VIH sur l'activité des pDC ..... 47
4.2.1 La production d'IFN-α induite par le VIH-1 ..... 47
4.2.1.1 *In vitro* ..... 47
4.2.1.2 *Ex vivo* et *in vivo* ..... 48
4.2.2 Effet du VIH sur la production d'autres cytokines et l'état d'activation des pDC ..... 49
4.3 Rôle des pDC dans l'infection par le VIH-1 ..... 50
4.3.1 Infection productive des pDC par le VIH-1 ..... 50
4.3.2 Les fonctions des pDC dans l'infection aigüe et chronique par le VIH-1 ..... 51
4.3.2.1 Les effets bénéfiques des pDC sur la réplication virale du VIH-1 ..... 52
4.3.2.2 Les effets néfastes des pDC sur les cellules de l'immunité dans l'infection par le VIH-1 ..... 53
5 La lignée cellulaire de pDC : les cellules GEN2.2 ..... 55
Objectifs du travail de thèse ..... 57
Résultats ..... 59
Manuscrit 1 ..... 60
L'infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes par le VIH-1 est inhibée par les anticorps neutralisants mais pas par les anticorps non-neutralisants inhibiteurs. ..... 61
Manuscrit 2 ..... 94
Inhibition du transfert du VIH-1 des cellules dendritiques plasmacytoïdes aux lymphocytes T CD4 ..... 95
Publication 1 ..... 115

Stimulation de la réplication du VIH-1 dans les cellules dendritiques immatures en contact avec des lymphocytes primaires T-CD4 ou B..... 116

Publication 2..... 128

Les anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs inhibent efficacement la réplication du VIH-1 dans les cellules dendritiques interstitielles et de Langerhans. ..... 129

Manuscrit 3..... 139

Les anticorps neutralisants inhibent le transfert du VIH-1 des cellules dendritiques primaires aux lymphocytes T CD4 autologues..... 140

Conclusion..... 171

Bibliographie..... 181

# Liste des figures

Figure 1 : Prévalence et nombre de personnes infectées et décès dans le monde par le VIH en 2009. ..... 4

Figure 2 : Structure de la particule virale du VIH-1. ..... 5

Figure 3 : Structure génomique du provirus du VIH-1 et fonctions des protéines issues de l'expression de ce génome. ..... 6

Figure 4 : Cycle réplicatif du VIH-1. ..... 7

Figure 5 : Physiopathologie de l'infection par le VIH-1. ..... 10

Figure 6 : Voies de transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses sexuelles. ..... 11

Figure 7 : Mécanismes d'action des anticorps neutralisants et non-neutralisants sur l'infection par le VIH-1. ..... 19

Figure 8 : Structure primaire de la gp120 avec la position des boucles variables V1 à V5. ..... 24

Figure 9 : Structure de la gp120. ..... 25

Figure 10 : Épitope reconnu par les anticorps neutralisants monoclonaux dirigés contre la gp120 et la gp41. ..... 27

Figure 11 : Stratégie vaccinale contre le VIH-1. ..... 31

Figure 12 : Les modèles de transfert en *trans* du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4. ..... 37

Figure 13 : Mécanismes de transmission du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4. ..... 38

Figure 14 : Voies d'activation des TLR dans les pDC. ..... 43

# Abréviations

| | |
|---|---|
| Ac : | Anticorps |
| AcN : | Anticorps neutralisant |
| AcNNI : | Anticorps non neutralisant inhibiteur |
| AcNNNI : | Anticorps non neutralisant non inhibiteur |
| ADCC : | *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* |
| ADCVI : | *Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition* |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| APC : | *Antigen presenting cell* |
| APOBEC : | *Apolipoprotein B mRNA-editing complex* |
| ARN(m) : | Acide ribonucléique (messager) |
| ART : | *Antiretroviral therapy* |
| BCR : | *B cell receptor* |
| BDCA : | *Blood dendritic cell antigen* |
| CCL : | ligand des récepteurs CCR ; aussi appelé chimiokine de la famille CC ou chimiokines β |
| CCR : | récepteur des chimiokines de la famille CC |
| CD : | *Cluster of differentiation* |
| CDR : | *Complementary determining region* |
| CLR : | *C-type lectin receptor* |
| CMH : | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CRF : | *Circulating recombinant form* |
| CXCL : | ligand des récepteurs CXCR ; aussi appelé chimiokines de la famille CXC ou chimiokines α |
| CXCR : | récepteur des chimiokines de la famille CXC |
| DC : | *Dendritic cell* |
| DCIR : | *Dendritic cell immunoreceptor* |
| DC-SIGN : | *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* |
| ELISA : | *Enzyme-linked immunosorbent assay* |
| Fab : | Fragment *antibody binding* de l'immunoglobuline |
| Fc : | Fragment cristallisable de l'immunoglobuline |
| GALT : | *Gut associated lymphoid tissue* |
| gp : | *glycoprotein* |
| HEPS : | *Highly exposed, persistently seronegative* |

HEV : *High endothelium venule*

HLA : *Human leukocyte antigen*

HSV : *Herpes simplex virus*

IDO : Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase

IFN : Interféron

Ig(G) : Immunoglobuline (G)

IL : Interleukine

ILT : *Immunoglobuline-like transcript*

IPC : *Interferon-producing cell*

IRF : *Interferon regulatory transcription factor*

ITAM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*

ITIM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*

LC : Langerhans cell

LTNP : *Long term non progressor*

MDDC : *Monocyte derived dendritic cell* ; aussi abrégé MoDC

MIP : *Macrophage inflammatory protein*

MPER : *Membrane-proximal external region*

NF-κB : *Nuclear factor-κ B*

NK : cellule *Natural Killer*

ONU : Organisation des Nations unies

PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC : *Peripheral blood mononuclear cell*

pDC : *plasmacytoid dendritic cell*

RANTES : *Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*

RFc(γ) : Récepteur du fragment cristallisable des immunoglobulines (G)

SDF-1 : *Stromal derived factor-1*

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SIV : *Simian immunodeficiency virus*

TCLA : *T-cell line-adapted*

TLR : *Toll-like receptor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TRAIL : *TNF-related apoptosis inducing ligand*

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

# Introduction

# Chapitre 1 Le Virus de l'Immunodéficience Humaine

## 1 Un virus dans le monde…

L'histoire du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) commence en 1981 à Atlanta, aux Etats-Unis, avec le Centre de Contrôle des Maladies (CDC) qui recensa une augmentation du nombre de cas d'infection de jeunes hommes homosexuels par *Pneumocystis carinii* (Gottlieb et al., 1981; Siegal et al., 1981). Ce germe présent dans l'air ambiant ne cause pas de maladie chez les personnes ayant un système immunitaire efficace. Ces individus étant sains, la survenue de cette infection a été attribuée à une déficience de leur système immunitaire : le syndrome de l'immunodéficience acquise venait de naître. Les scientifiques ont rapidement soupçonné un rétrovirus comme étant l'agent responsable de cette maladie, pour deux raisons : i) ce type de virus avaient déjà été impliqués dans plusieurs modèles animaux de déficits immunitaires, ii) le rétrovirus HTLV-1 (*Human T Lymphotropic Virus-1*) venait d'être découvert par Robert Gallo en 1980 chez les patients atteints de leucémies et lymphomes T. Il fallut attendre 1983 pour que Françoise Barré-Sinoussi, alors dans l'équipe de Luc Montagnier, découvre l'agent responsable du SIDA : un rétrovirus d'abord nommé LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*), puis finalement renommé VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine, ou *HIV* en anglais) (Barre-Sinoussi et al., 1983). En récompense pour ces travaux, Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier ont été lauréats du Prix Nobel de médecine en 2008.

Plus tard, en 1986, un second virus similaire au premier est isolé par François Clavel chez des patients atteints du SIDA, originaires d'Afrique de l'Ouest (iles du Cap Vert et Guinée Bissau) (Clavel et al., 1986). Ce VIH-2 est génétiquement distinct du VIH-1 puisqu'il ne présente que 40 à 50 % d'homologie de séquence avec le VIH-1. Le VIH-2, tout comme le VIH-1, est responsable du SIDA, mais les caractéristiques cliniques et biologiques de la maladie sont différentes : le VIH-2 se réplique plus lentement, il se transmet moins efficacement et le SIDA se déclare plus tardivement. Dans la même période, l'analyse des premières séquences génétiques de différents isolats viraux du VIH-1 montrent une variabilité importante du génome de ce virus (Ratner et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985). Au fur et à mesure du temps, le séquençage des souches virales a permis de classer le VIH-1 en quatre groupe : le groupe M (pour majeur), le groupe O (pour *outlier*), le groupe N (pour non-M et non-O) et le groupe P (Hemelaar, 2012; Tebit and Arts, 2011). Les virus du groupe M sont distribués partout à la surface du globe alors que les virus des trois autres groupes restent localisés dans certaines régions du continent africain, notamment à l'ouest (Tebit and Arts, 2011). Les virus du groupe M sont subdivisés en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J et K) et des phénomènes d'échange de matériel génétique entre ces sous-types ont

donné naissance aux formes recombinantes circulantes (CRF) qui sont de plus en plus fréquentes et complexes (Hemelaar, 2012). Les virus du groupe M sont responsables de la quasi-totalité des infections avec une prédominance des sous-types A, B et C (Hemelaar, 2012). La distribution géographique de ces sous-types dépend de l'ancienneté de l'épidémie et du sous-type fondateur selon la région considérée. Le sous-type B est plus répandu en Europe, en Amérique du Nord et en Australie, le sous-type C (considéré comme le plus virulent) en Afrique de l'est et du sud, le sous-type A en Afrique centrale, alors que la CRF A/E est prédominant en Asie.

En parallèle, les origines du VIH s'éclaircissent. Un virus similaire nommé virus de l'immunodéficience simienne (ou SIV pour l'acronyme anglais) est découvert chez le chimpanzé (Huet et al., 1990), puis dans plusieurs espèces de singes africains en liberté comme les singes verts, les mandrills, les gorilles et le singe mangabey ; et chez les singes asiatiques dont les macaques (notamment *Macacca mulatta*, encore appelé macaque rhésus). L'analyse phylogénétique des virus de l'immunodéficience montre un lien de parenté entre les VIH-1 et les SIV présents chez les chimpanzés (SIVcpz) de même qu'entre le VIH-2 et le SIV des singes mangabey (SIVsm) (Holmes, 2001). Il a été avancé que le SIV existe depuis plus de 32000 ans (Worobey et al., 2010), et s'est transmis à l'être humain vers les années 1900 (Hemelaar, 2012), lors de contacts avec des produits sanguins générés lors de l'abattage de singes et/ou suite à des morsures.

De nos jours, selon les estimations de l'ONUSIDA, 34 millions de personnes vivent avec le VIH-1 dont 2.5 millions d'enfants (moins de 15 ans), la majorité vivant en Afrique subsaharienne avec 22.9 millions dont 2.3 millions d'enfants (*World AIDS Day Report 2011*) (figure 1). Chaque année 1.8 millions de personnes meurent du SIDA, ce qui porte le nombre de décès total depuis le début de l'épidémie à environ 30 millions de personnes. En 2001, les chiffres étaient de 28.6 millions de personnes infectées dont 2 millions d'enfants, montrant que la pandémie continue de se propager. Une diminution du nombre de nouvelles infections est observée avec 3.1 millions de nouveaux cas en 2001 contre 2.6 millions aujourd'hui, néanmoins le nombre de personnes vivant avec le VIH augmente car l'accès aux traitements prolonge l'espérance de vie.

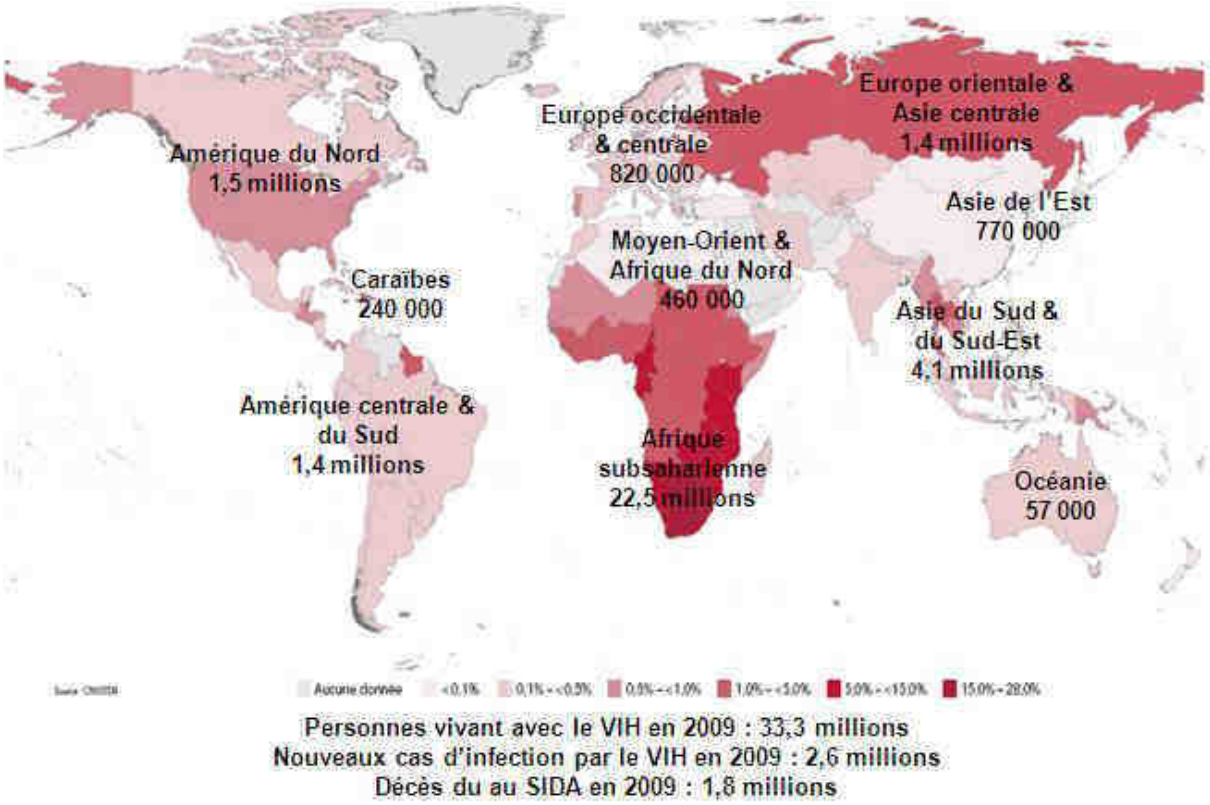



**Figure 1 : Prévalence et nombre de personnes infectées et décès dans le monde par le VIH en 2009.** Le taux de prévalence est calculé comme le nombre d'adultes (15-49 ans) vivant avec le VIH divisé par la population des 15-49 ans. (Source ONUSIDA).

# 2 … Un virus dans le corps

## 2.1 Structure de la particule virale du VIH-1

Appartenant aux virus de la famille des Retroviridae, le VIH est un virus enveloppé de 90 à 120 nm de diamètre. L'enveloppe d'origine cellulaire est une bicouche lipidique comportant des spicules formés de trimères des glycoprotéines de surface (gp120, SU) et transmembranaire (gp41, TM) (Zhu et al., 2006), ainsi que plusieurs protéines humaines provenant de la cellule dont le virus a bourgeonné (Stoiber et al., 2008). Sous cette enveloppe se trouve une couche de protéine de matrice (MA, p17) et la protéase virale (PR, p10). Enfin, la protéine de capside (CA, p24) forme une structure conique renfermant le matériel génétique du virus constitué de deux molécules d'ARN de polarité positive identiques recouvertes par la protéine de nucléocapside (NC, p7), la transcriptase inverse (RT, p51/p66) et l'intégrase (IN, p32) (Briggs and Kräusslich, 2011) (figure 2).

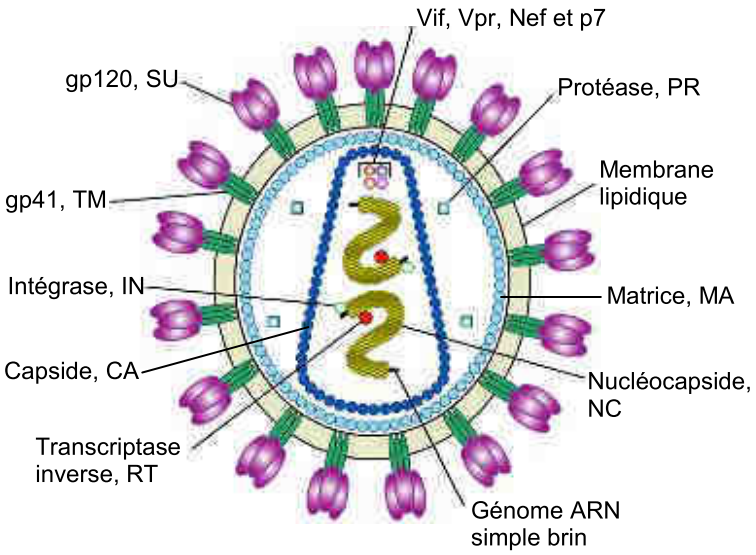



**Figure 2 : Structure de la particule virale du VIH-1.**
(source NIH (*National Institute of Health*))

## 2.2 Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 est un ARN de polarité positive d'environ 9200 nucléotides possédant aux extrémités une séquence répétée R qui est flanquée d'une région unique dite U5 pour l'extrémité 5' et U3 pour l'extrémité 3' (Frankel and Young, 1998). Le génome porte les gènes gag (pour group-specific antigen), pol (pour polymerase) et env (pour envelope glycoprotein) trouvés classiquement chez tous les rétrovirus, ainsi que des gènes supplémentaires codant pour les protéines régulatrices (tat, rev) et auxiliaires (nef, vif, vpr et vpu), caractéristiques des virus du genre Lentivirus dont le VIH fait partie. Le gène gag code pour un précurseur polyprotéique nommé $Pr55^{gag}$ qui, après clivage par la protéase virale, donne naissance aux protéines structurales MA, CA, NC et p6. Les enzymes codées par le gène pol sont initialement synthétisée sous la forme d'une polyprotéine, $Pr160^{gagpol}$, qui résulte d'un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de $Pr55^{gag}$. Les enzymes PR, RT et IN sont clivées par la protéase virale PR. Les glycoprotéines d'enveloppe sont aussi synthétisées sous forme d'un précurseur polyprotéique appelé gp160. A la différence de $Pr55^{gag}$ et de $Pr160^{gagpol}$, la gp160 est clivée par une protéase cellulaire, la furine, générant les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Freed, 2001). L'organisation génomique et les principales fonctions des protéines du VIH-1 sont représentées sur la figure 3.

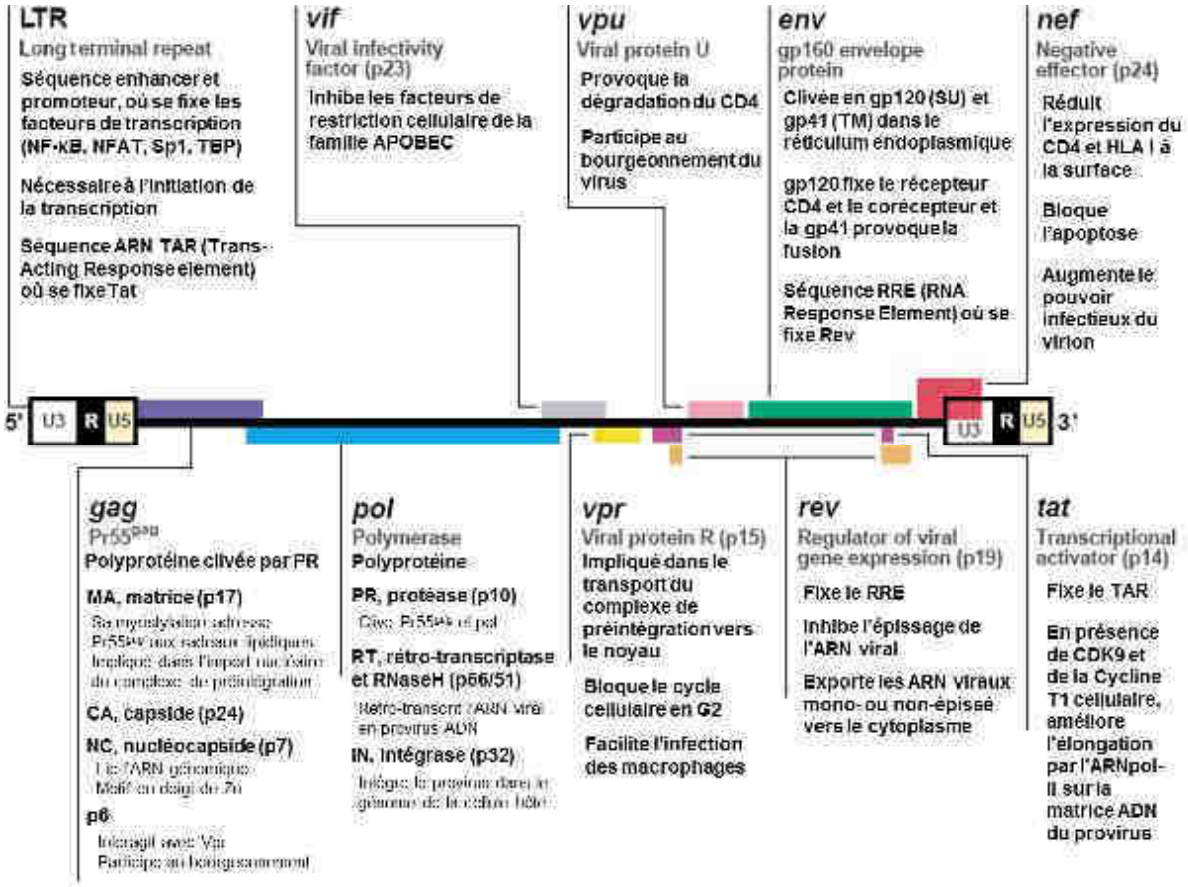



**Figure 3 : Structure génomique du provirus du VIH-1 et fonctions des protéines issues de l'expression de ce génome.**

(modifiée d'après Greene et al, 2002)

## 2.3 Cycle réplicatif du VIH-1

Le cycle réplicatif du VIH-1 est résumé sur la figure 4.

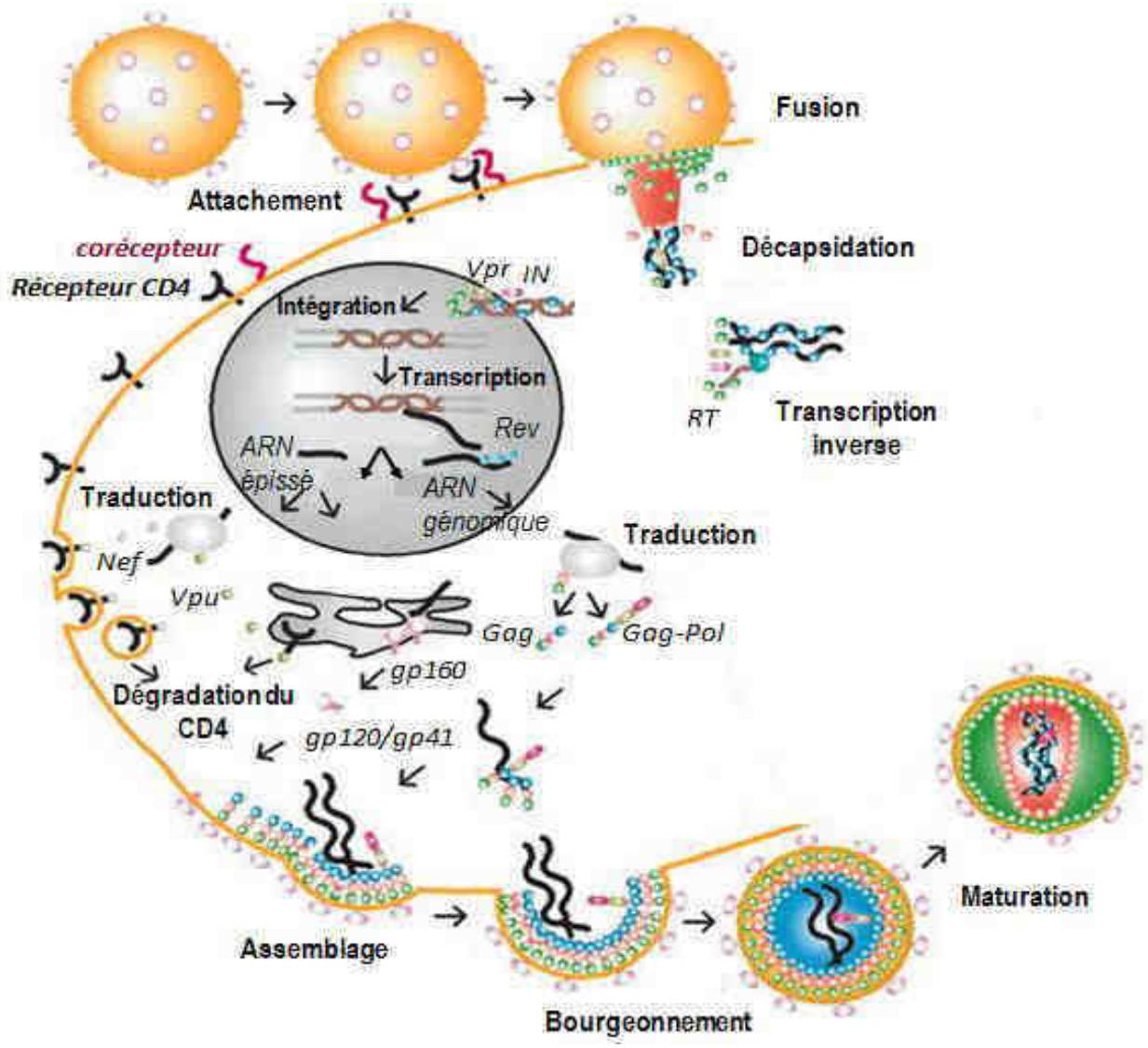



**Figure 4 : Cycle réplicatif du VIH-1.**
(modifiée d'après Turner et al, 1999)

### 2.3.1 Étape précoce. De l'entrée du virus à l'intégration de son génome.

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible se fait par l'intermédiaire des hétérotrimères de glycoprotéines gp120 et gp41 présents à la surface du virus. La gp120 se lie en premier au récepteur primaire du VIH-1, le CD4 (Dalgleish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Une modification conformationnelle de la gp120 se produit lui permettant de se lier au corécepteur. Les corécepteurs identifiés font partie de la famille des récepteurs aux chimiokines. Les deux principaux corécepteurs du VIH sont le CCR5 (Deng et al., 1996) et le CXCR4 (Feng et al., 1996), bien que d'autres permettent l'entrée du virus tel que le CCR3 (Scarlatti et al., 1997). Certains isolats de virus se répliquent plus efficacement dans des cellules exprimant le CCR5 comme les lymphocytes T CD4 mémoires primaires, les macrophages ou les cellules dendritiques, et sont qualifiés de virus de tropisme R5. Les virus de tropisme X4 se répliquent plus efficacement dans

les cellules exprimant le CXCR4 comme les lymphocytes T CD4 primaires et les lignées de lymphocytes T CD4. Chez certains patients, des virus possédant les deux tropismes à la fois (R5X4 ou dual-tropic) peuvent apparaître au cours de la maladie. L'interaction séquentielle entre la gp120, le CD4 et le corécepteur provoque un changement de conformation de la gp41 lui permettant d'initier la fusion des membranes du virus et de la cellule (Checkley et al., 2011).

Les évènements survenant après la fusion restent encore la partie la moins comprise dans le cycle du virus, principalement en ce qui concerne le déroulement de la décapsidation et son importance dans la transcription inverse et le transport vers le noyau (Arhel, 2010). Néanmoins après la fusion, un complexe de retro-transcription se forme, contenant le génome diploïde d'ARN, les protéines RT, IN, MA, NC et Vpr. La RT du virus possède une faible affinité pour la matrice ARN ayant pour conséquence une dissociation fréquente entre l'enzyme et la matrice. En présence de deux molécules d'ARN viral génétiquement non identique, des changements de matrice entraînent la formation d'un ADN recombinant dérivant des deux ARN parents. Associé au taux de mutation élevé de la RT ($3x10^{-5}$ mutations par base et par cycle), cette recombinaison génère rapidement une forte hétérogénéité dans la séquence génétique de la population de VIH (dénommée « quasi-espèces »). Ce phénomène est à l'origine de la diversité des souches retrouvées sur la planète, et, chez l'individu infecté, va permettre au virus d'échapper à la réponse immunitaire et de développer des résistances aux traitements anti-retroviraux (Freed, 2001). La retro-transcription achevée, l'ensemble ADN, IN, MA, Vpr et RT forment le complexe de pré-intégration (PIC) qui va entrer dans le noyau de la cellule grâce aux protéines IN, MA et vpr. L'intégrase clive alors quelques nucléotides aux deux extrémités 3' de l'ADN linéaire et intègre à l'ADN cellulaire le matériel génétique viral qui porte alors le nom de provirus (Greene and Peterlin, 2002).

### 2.3.2 Étape tardive. De l'expression du génome au bourgeonnement du virus.

Le provirus se comporte comme n'importe quel gène humain : la séquence LTR en 5' contient des séquences enhancers capables de recruter des facteurs tels que NF-κB, des séquences promotrices comme la TATA-box. Ces éléments permettent de positionner l'ARN polymerase II pour initier la transcription. La transcription du génome viral reste tout de même très peu efficace dû à la présence, en 3' de l'initiateur, d'une séquence de régulation appelée TAR (transactivation response). La liaison de la protéine virale Tat à cette séquence permettra de recruter différents facteurs stimulant la transcription des gènes du VIH (Peterlin and Trono, 2003). Cependant, la majorité des ARNm cellulaires sont épissés avant de pouvoir sortir du noyau, ce qui pose un problème pour l'export de l'ARN viral complet non-épissé qui constitue à

la fois le génome des futurs virions et la séquence codante pour les gènes de structure ($Pr55^{gag}$) et d'enzymes ($Pr160^{gagpol}$). L'accumulation progressive de la protéine Rev va permettre de surmonter cet obstacle. En effet, Rev se lie à une structure complexe en tige-boucle de l'ARN viral appelé RRE (Rev response element), et la séquence riche en leucine de Rev entraîne l'export du complexe Rev-ARN vers le cytoplasme (Greene and Peterlin, 2002).

La polyprotéine précurseur de l'enveloppe gp160 est produite au niveau du réticulum endoplasmique où elle s'oligomérise pour former une structure trimérique. La glycosylation de la gp160 se fait dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi au cours de son transport vers la membrane plasmique. Pendant son passage dans l'appareil de Golgi, la furine (protéase cellulaire) clive la gp160 pour générer l'hétérotrimère de gp120 et gp41 (Checkley et al., 2011). D'autre part, les ARNm codant pour les polyprotéines $Pr55^{gag}$ et $Pr160^{gagpol}$ sont traduit dans le cytoplasme. L'extrémité N-terminale du domaine MA des polyprotéines subissent une myristylation leur permettant de se fixer à la membrane plasmique où elles interagissent avec la partie intracellulaire de la gp41 (Turner and Summers, 1999). Le dimère d'ARN viral va se fixer à la partie NC de $Pr55^{gag}$, et certaines protéines accessoires (comme Vpr, Vif ou Nef) sont incorporées à la particule virale bourgeonnante. Pour pouvoir devenir infectieuse, la particule virale ainsi produite doit nécessairement subir la maturation où PR clive l'ensemble des polyprotéines $Pr55^{gag}$ et $Pr160^{gagpol}$, amenant à la structure définitive de la particule virale (figure 1). Une particule virale mature d'isolat primaire du VIH-1 porte à sa surface environ 14 spicules d'enveloppe (Zhu et al., 2006).

Ainsi, chez un individu infecté, le nombre de particules virales produites chaque jour s'élève à $10^9$ (Ho et al., 1995), dont 0,1 % sont considérées comme infectieuses, soit $10^7$ chaque jour. Les traitements actuellement disponibles contre le VIH font diminuer cette production virale quotidienne en s'attaquant à différentes étapes du cycle réplicatif du virus via des inhibiteurs de fusion, des inhibiteurs de la transcriptase inverse, et des inhibiteurs de la protéase.

## 2.4 La physiopathologie du VIH

La chronologie de l'infection par le VIH suit une évolution en trois phases distinctes : la phase aigüe (ou primo-infection), la phase asymptomatique (ou phase de latence clinique) et la phase SIDA (figure 5).

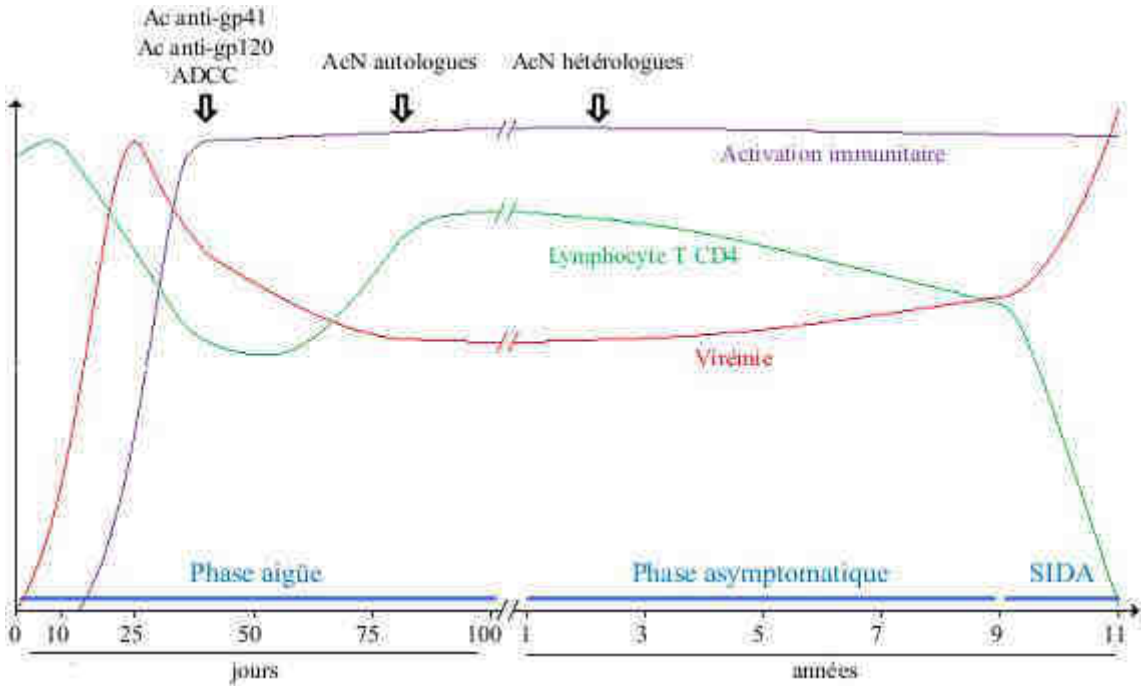



**Figure 5 : Physiopathologie de l'infection par le VIH-1.**

La virémie, le taux de lymphocytes T CD4 plasmatiques, l'activation immunitaire et l'apparition des différents anticorps dirigés contre l'enveloppe virale sont représentés au cours des trois phases de l'évolution de l'infection par le VIH-1.

### 2.4.1 Transmission du VIH et phase aigüe

La transmission sexuelle du VIH suite à l'exposition des muqueuses à du virus libre ou associé à des cellules représente la principale voie de contamination par le VIH (plus de 80 % des transmissions chez l'adulte, Global Report UNAIDS). Les voies moins fréquentes, qui ne seront pas détaillées par la suite, incluent la transmission lors d'injection de drogue, l'exposition à du sang ou des produits sanguins via la transfusion, et l'exposition au VIH du fœtus ou nouveau-né par la mère infectée.

La difficulté d'identifier les personnes infectées rapidement après leur exposition est un frein dans l'étude des évènements précoces de la transmission du VIH au niveau des muqueuses. La compréhension de ce processus provient en large partie des études menées sur le modèle d'infection par le SIV (Haase, 2005) et sur les études épidémiologiques et les modèles *ex vivo* chez l'être humain (Hladik and McElrath, 2008). Les premiers modèles *ex vivo* basés sur des cocultures de cellules présentes au site d'entrée, comme les cellules de Langerhans (LC), les cellules dendritiques (DC) ou les macrophages, ont démontré que l'infection productive survient à la suite de contacts rapprochés avec les lymphocytes T CD4 cibles (Pope and Haase, 2003) (figure 6). L'étude d'explant de tissu vaginal humain a montré que le VIH peut infecter les LC ou se fixer à leur surface et être protégé afin de traverser l'épithélium et ainsi former des complexes avec les lymphocytes T CD4 (Hladik et al., 2007) (figure 6). Ces phénomènes sont résumés par

un modèle de synapse virologique (voir 2.1 ci-dessous) où la proximité, l'attachement du virus à des molécules comme les lectines et les endosomes protecteurs à l'intérieur des LC et DC aident le VIH à établir une infection productive (Arthos et al., 2008; Piguet and Steinman, 2007; Wu and KewalRamani, 2006). Les études chez le macaque ont permis de montrer que le SIV se réplique dans une population de lymphocytes T CD4 partiellement activés, moins d'une semaine après exposition, et qu'ensuite le SIV se propage localement dans une population plus susceptible de lymphocytes T CD4 activés (Li et al., 2005; Zhang, 1999). Le virus migre alors rapidement, probablement par les ganglions lymphatiques drainants, vers les GALT (acronyme anglais de tissus lymphoïdes associés aux muqueuses de l'intestin) où il induit une déplétion massive des lymphocytes T CD4 mémoires aussi bien dans le modèle animal (Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005) que chez l'être humain (Brenchley, 2004; Mehandru, 2004).

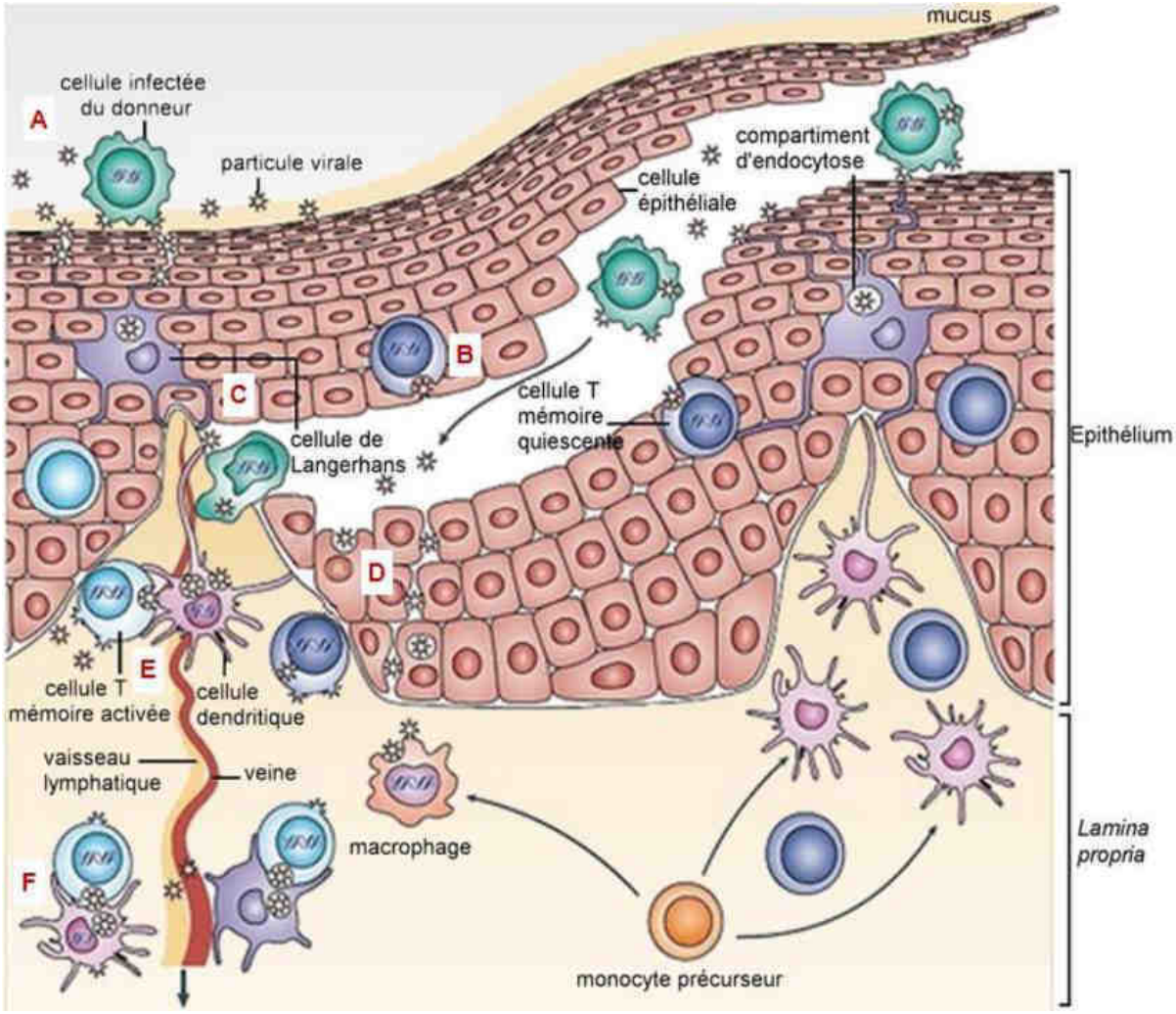



**Figure 6 : Voies de transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses sexuelles.**

(A) Les particules virales ou les cellules infectées transmises entrent en contact avec les cellules épithéliales et/ou les cellules de Langerhans résidentes. (B) Les lymphocytes T CD4 résidents dans

l'épithélium peuvent être infectés par le VIH-1. (C) Les éventuelles brèches ou lésions dans l'épithélium peuvent permettre aux particules virales ou aux cellules infectées d'atteindre la lamina propria. (D) Le VIH-1 peut passer entre les cellules épithéliales ou à travers les cellules épithéliales via la transcytose. (E) Les cellules résidentes de la lamina propria (DC, macrophages, lymphocytes T CD4 mémoire) peuvent être infectées par le VIH-1 et des phénomènes de transfert du virus de cellule à cellule peuvent survenir. (F) La migration des cellules infectées vers les tissus lymphoïdes va permettre l'établissement de l'infection. (modifiée d'après Hladik et al, 2008).

Actuellement, plusieurs groupes se penchent sur la nature du virus transmis lors de l'infection. Il a ainsi pu être démontré que le virus transmis était, dans la majorité des cas, un virus fondateur unique (ou cellule infectée « fondatrice ») (Keele et al., 2008). La première signature phénotypique mise en avant pour distinguer ce virus fondateur des autres a été la faible glycosylation de sa gp120 (Derdeyn, 2004) et l'utilisation du corécepteur CCR5 (tropisme R5) pour établir l'infection (Liu et al., 1996). Le tropisme R5 du virus fondateur repose très probablement sur l'expression du CCR5 à la surface des lymphocytes T CD4 mémoires présents dans le GALT, favorisant ainsi sa réplication (Brenchley, 2004; Mehandru, 2004). En parallèle, d'autres études suggèrent que la déplétion massive des lymphocytes T CD4 au niveau des GALT serait liée à la capacité de la gp120 à se fixer à l'intégrine α4β7 (Arthos et al., 2008; Cicala et al., 2009), qui constitue un facteur permettant la relocalisation des lymphocytes T CD4 au niveau des GALT. Enfin, une étude récente a montré que supprimer la glycosylation sur la gp120 accroît sa capacité à se fixer à l'intégrine α4β7, et que la gp120 d'un virus fondateur est plus à même de se fixer à l'intégrine α4β7 que la gp120 d'isolats chroniques (Nawaz et al., 2011). Néanmoins le faible nombre de gp120 de virus fondateurs étudiés ne permet pas d'estimer l'importance de la fixation à l'intégrine α4β7 dans les phénomènes précoces de la transmission du virus, ni à quel moment de la transmission cette fixation jouerait un rôle.

Toutefois, même si des variations existent selon la voie d'exposition au VIH (Hladik and McElrath, 2008), l'apparition de marqueurs viraux et hôtes sont généralement uniformes en ordre et en temps (Fiebig et al., 2003). Immédiatement après l'exposition et la transmission, comme le VIH se réplique localement, le virus ne se détecte pas dans le plasma ; cette phase, appelée éclipse, dure environ 10 jours (Fiebig et al., 2003; Keele et al., 2008). Le VIH se réplique très fortement en l'absence de réponse immunitaire, et la virémie atteint un pic autour de trois à quatre semaines post-exposition et décline spontanément pour les mois à venir jusqu'à se stabiliser à une charge virale à l'équilibre (également nommé « set point ») (Fiebig et al., 2003). La phase ascendante de ce pic de virémie est due à la réplication intensive du virus fondateur, qui ne diverge que lorsque survient la réponse immunitaire cellulaire (Goonetilleke et al., 2009; Salazar-Gonzalez et al., 2009). En effet, la réponse T CD8 est détectée quelques jours avant le pic de virémie (McMichael et al., 2009), et provoque l'apparition de mutations dans les épitopes

reconnus par ces lymphocytes T CD8 (Salazar-Gonzalez et al., 2009). Le virus va modifier sa séquence en acides aminés en l'espace de 10 à 21 jours (Goonetilleke et al., 2009). L'activité cytotoxique dirigée contre les premiers épitopes va permettre de tuer les cellules infectées produisant du virus et participe à la diminution de la virémie jusqu'à la charge virale à l'équilibre (McMichael et al., 2009). De son côté, la réponse humorale initiale ne permet pas d'obtenir d'anticorps neutralisants, et ceux-ci ne participent donc pas à la pression de sélection (Tomaras et al., 2008). Bien que le virus fondateur soit caractérisé par une faible glycosylation de son enveloppe et une sensibilité accrue à la neutralisation (Derdeyn, 2004), il faut attendre environ 12 semaines après la transmission pour que des anticorps neutralisants apparaissent. Cependant, cette réponse est trop faible, trop tardive, puisque le virus fondateur sensible à ces anticorps est déjà remplacé par des virus mutés et résistants à ces anticorps (Richman, 2003; Wei et al., 2003). L'enveloppe de ces virus résistants est généralement plus glycosylée, constituant un bouclier glycannique qui préviendrait la fixation de ces anticorps neutralisants (Wei et al., 2003). De plus, l'infection aigüe par le VIH affecte profondément les lymphocytes B des tissus et du sang. Le VIH-1 induit un changement de classe précoce chez les clones B et est associé à une augmentation du nombre de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes en même temps qu'une diminution du nombre de lymphocytes B naïfs. Au niveau des GALT, où le VIH se réplique fortement pendant la phase aigüe, le VIH induit la lyse des B folliculaires, une apoptose massive des B et la perte de 50 % des centres germinatifs dans les 80 premiers jours après l'infection (McMichael et al., 2009). La perte précoce de ces centres germinatifs entraverait la génération rapide d'une réponse humorale de haute affinité contre le VIH et mènerait au délai observé dans la fabrication d'anticorps neutralisants autologues.

Cette phase aiguë de l'infection est accompagnée d'une faible diminution de la concentration en lymphocytes T CD4 dans le sang qui n'est que le mince reflet de la déplétion massive en lymphocytes T CD4 mémoire $CCR5^+$ présents dans les GALT. Cette diminution s'inverse ensuite, pendant que la virémie diminue, mais la concentration plasmatique en lymphocytes T CD4 ne retournera jamais à sa valeur initiale, avant l'infection (Grossman et al., 2006). Les lymphocytes T CD4 vont alors décroître lentement, marquant le début de la phase asymptomatique.

### 2.4.2 Phase asymptomatique et phase SIDA

La phase asymptomatique est caractérisée par une virémie stable issue de la réplication chronique du VIH au sein de réservoirs. Les réservoirs du VIH désignent à la fois les tissus lymphoïdes dans lesquels le virus s'est disséminé pendant la phase aigüe, et les cellules infectées répliquant fortement le virus ou au contraire portant un virus latent. Dans le premier cas, les tissus lymphoïdes fournissent au VIH une grande quantité de cellules cibles (lymphocytes T CD4,

macrophages, cellules dendritiques), une propagation cellule à cellule facilitée par les contacts et une résistance à la pénétration des traitements. Dans le second cas, le VIH peut infecter des lymphocytes T CD4 au repos et, à la condition qu'ils s'activent, aboutir très rarement à une infection productive, suivie d'un retour à l'état de repos. Même en présence d'une thérapie antirétrovirale (ART), ces lymphocytes T CD4 au repos infectés de manière latente persistent longtemps dans l'individu et peuvent se réactiver pour produire du virus, maintenant ainsi une réplication virale continue faible qui constitue le réservoir viral (Moir et al., 2011).

En ciblant les lymphocytes T CD4, le VIH dérégule et détruit un constituant majeur de la réponse immunitaire. Mais le VIH induit également des dysfonctions chez les lymphocytes T CD8, lymphocytes B et autres cellules via des mécanismes tels que l'augmentation du renouvellement cellulaires, l'activation, la différenciation et les réponses homéostatiques. Ensemble, ces facteurs mènent à des changements qualitatifs dans chaque population cellulaire de l'immunité affectant entièrement les capacités de réponses immunologiques. Dans le modèle d'infection non-pathogène par le SIV, la déplétion précoce des lymphocytes T CD4 dans le GALT est également observée, mais la reconstitution de cette population au cours de la phase asymptomatique est généralement totale, à la différence du VIH ou du modèle d'infection pathogène par le SIV. La perte de cette intégrité cellulaire dans les muqueuses a été associée à la translocation de produits microbiens depuis la lumière de l'intestin dans la circulation, contribuant à une activation immunitaire systémique induite par le VIH. Les premières études menées sur les patients infectés ont également montré la destruction des tissus lymphoïdes en causant des hyperplasies des follicules et centres germinatifs. Bien que les conséquences immunologiques exactes de ces changements tissulaires induits par le VIH ne soient pas élucidées, leur apparition a très probablement un impact sur l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale efficace, par exemple en interrompant un trafic lymphocytaire normal (Grossman et al., 2006).

Puisque les populations de lymphocytes T CD8, lymphocytes B ou cellules NK (*Natural Killer*) subissent un renouvellement accru concomitant avec la virémie du VIH, l'idée que l'activation immunitaire, plutôt qu'une homéostasie spécifique des lymphocytes T CD4, est à l'origine de ce renouvellement soutenu est souvent avancée (Grossman et al., 2006). En effet, un traitement ART permet de réduire le renouvellement des lymphocytes T CD4 et T CD8, et des changements similaires se produiraient pour les lymphocytes B et les cellules NK dans le modèle d'infection par le SIV (Moir et al., 2011). Toutefois, si le taux de renouvellement est augmenté pour les lymphocytes T CD4 et T CD8, le nombre de T CD8 augmente pendant la phase asymptomatique, alors que le nombre de lymphocytes T CD4 diminue, probablement parce que ces derniers sont détruits suite à leur infection (Grossman et al., 2006; Moir et al., 2011). Le traitement ART va permettre de restaurer le nombre de lymphocytes T CD4, et de diminuer la stimulation des

lymphocytes T CD8 (Moir et al., 2011), alors que la réplication virale a toujours lieu à un faible niveau. Ainsi, les changements de dynamique de la population de lymphocytes T CD4 induits par le VIH semblent être du à des effets indirects de la réplication virale (Grossman et al., 2006), qui mèneront progressivement à la perte de la capacité de régénération des lymphocytes T CD4. De plus, la qualité de la réponse immunitaire mise en place par ces cellules s'avère être importante puisque une réponse de moindre qualité de la part des lymphocytes T CD8 est associée avec une activité cytolytique réduite et une diminution de la polyfonctionnalité de ces cellules. De même, chez les patients sous ART, les lymphocytes T CD4 produisent de l'interleukine (IL)-2 et de l'interféron (IFN)-γ, alors que chez les patients non traités, ils ne produisent que de l'IFN-γ (Moir et al., 2011).

La perte de la capacité de régénération des lymphocytes T CD4 va entraîner une diminution progressive de leur nombre au cours de la phase asymptomatique, puis, lorsque la concentration plasmatique passe sous 200 cellules/µL, cette diminution s'accélère marquant le début de la phase SIDA. L'infection aigüe et chronique est caractérisée par un virus de tropisme R5, puis en fin de maladie, le tropisme du virus change pour un tropisme R5/X4 ou X4. En effet, l'analyse génétique de la quasi-espèce de VIH chez des patients en phase asymptomatique mort d'une cause non liée à la maladie n'a pas révélé la présence de virus de tropisme X4 (Weber, 2001). Pourtant le changement de tropisme peut s'opérer par la mutation de deux acides aminés sur la gp120, et étant donné la forte variabilité génétique du VIH, ce changement de tropisme devrait survenir tôt dans la maladie. L'hypothèse généralement avancée est une plus grande susceptibilité du virus de tropisme X4 à la réponse immunitaire cellulaire. La diminution progressive des lymphocytes T CD4 entraîne une diminution de la stimulation et la coordination de la réponse immunitaire adaptative, supprimant la pression de la réponse cytotoxique, offrant alors une opportunité pour le virus de changer de tropisme. Le VIH de tropisme CXCR4 cible et tue les lymphocytes T CD4 naïfs et centraux mémoires, augmentant de façon substantielle la quantité de cible pour le virus que représentait les cellules exprimant le CCR5 (lymphocytes T CD4 activés, macrophages et DC). Dès lors, le VIH se multiplie intensément expliquant l'accélération de la perte des lymphocytes T CD4 (Weber, 2001).

Finalement, le système immunitaire échoue lorsque il devient incapable de maintenir un taux de lymphocytes T effecteurs au-dessus du seuil nécessaire pour résister efficacement aux pathogènes (Grossman et al., 2006). L'individu infecté par le VIH va contracter des maladies opportunistes d'origine bactériennes, fongiques, parasitaires ou virales, conduisant à la mort.

### 2.4.3 Cas particuliers de l'évolution de la maladie

Les facteurs hôtes et viraux influencent l'évolution naturelle de l'infection par le VIH-1 et la progression vers la maladie, comme mis en évidence par les études sur des patients fréquemment exposés au VIH mais non infectés (ou Highly Exposed, Persistently Seronegative, HEPS), ou des patients infectés progressant très lentement vers la maladie en absence de traitement (ou Long Term Non Progressor, LTNP). Chez les LTNP, le nombre de lymphocytes T CD4 reste stable et la virémie est souvent faible. Dans ce groupe, un sous-groupe de patients ayant une virémie indétectable (inférieure à 50 copies ARN/mL) sont appelés des contrôleurs élites (ou simplement élites ou HIC) (Piacentini et al., 2009). Les LTNP représentent 5 à 15 % des individus infectés par le VIH, et bien que les études soient peu nombreuses, il est admis que les élites comptent pour moins de 1 % des individus infectés (Deeks and Walker, 2007). En dépit des corrélats existants entre les facteurs hôtes et l'absence d'infection ou le contrôle de l'infection, les mécanismes immunitaires mis en jeu ne sont pas totalement connus.

#### 2.4.3.1 Polymorphisme du CCR5

Certains individus exposés mais non infectés sont homozygotes pour une délétion de 32 paires de bases dans le gène codant pour le CCR5 (Δ32-CCR5) (Liu et al., 1996). Le CCR5 tronqué n'est pas transporté à la surface des cellules et rend quasi-impossible l'infection de ces cellules par le VIH-1. De plus, les individus hétérozygotes pour cette mutation s'avèrent être infectés mais progressent plus lentement vers la maladie puisque la présence réduite de CCR5 fonctionnel rend l'entrée du virus plus difficile et donc diminue la réplication virale (Deeks and Walker, 2007). Par ailleurs, d'autres mutations affectant la structure de CCR5 ont été mises en évidence, ainsi que des variations d'haplotypes conduisant à une régulation transcriptionnelle du gène CCR5 différente, dont certaines sont en faveur d'une progression rapide vers le SIDA comme l'haplotype CCR5P1 ou la mutation intronique 59029-A/A (Piacentini et al., 2009).

#### 2.4.3.2 Ligand des corécepteurs

Etant donné l'importance des corécepteurs dans l'entrée du VIH, plusieurs études se sont portées sur le rôle de leurs ligands sur l'infection. Les ligands du CCR5 (RANTES/CCL5, MIP-1α/CCL3, MIP-1β/CCL4) sont capables d'inhiber toute réplication du VIH. Chez certains patients HEPS et LTNP, les taux de RANTES (CCL5) se sont avérés très élevés, suggérant que cette chimiokine prévient ou limite l'infection par le VIH (Piacentini et al., 2009). La chimiokine MIP-1α (CCL3) est considérée comme étant particulièrement efficace dans l'inhibition du VIH (Deeks and Walker, 2007). Les gènes CCL3, CCL4 et CCL5 proviennent d'une duplication d'un gène ancestral et il existe un nombre variable de copies non alléliques chez l'être humain, ce qui peut amener à une surproduction de ces protéines. Dans les cas présentant un nombre de copies du

gène CCL3 supérieurs à la médiane de la population, l'induction de l'internalisation du récepteur suite à la liaison de la chimiokine serait augmentée, réduisant la disponibilité du CCR5 pour le VIH (Piacentini et al., 2009). Le corécepteur CXCR4 a pour ligand naturel le SDF-1 (*Stromal Derived Factor-1*), retrouvé en grande quantité au niveau des muqueuses. Ainsi, le VIH de tropisme X4 aurait plus de difficulté à fixer son corécepteur au moment de la transmission et sa réplication serait bloquée (Agace et al., 2000). De plus, le CXCR4 jouant un rôle important dans les étapes avancées de la maladie suite au changement vers un tropisme X4, il a été suggéré, sans pouvoir être confirmé, qu'un variant du gène SDF-1 maintenant une production soutenue de SDF-1, conférerait aux individus homozygotes un délai dans l'apparition du SIDA (Piacentini et al., 2009).

#### 2.4.3.3 Polymorphisme des gènes HLA

Les gènes du HLA (*Human Leukocyte Antigen*) codent pour des protéines de surfaces responsables de la présentation antigénique aux lymphocytes T. Certains gènes du HLA de classe I, en particulier HLA-B ont été associés au contrôle du VIH. En effet, les allèles HLA-B5701 (fréquent dans les populations d'Europe et d'Amérique du Nord), HLA-B5703 (équivalent du précédent dans les populations d'Afrique), et HLA-B2705 sont plus fortement représentés chez les contrôleurs du VIH comparé aux non contrôleurs (Deeks and Walker, 2007; Moir et al., 2011). Les protéines du HLA sont également reconnues par les cellules NK, et une série d'études a montré que les individus exprimant à la fois le récepteur KIR3DS1 (un récepteur régulateur à la surface des NK) et le HLA-Bw4-081 (une famille d'allèle HLA se fixant au KIR3DS1) ont une charge virale à l'équilibre plus faible et un moindre risque de progresser vers le SIDA (Deeks and Walker, 2007).

#### 2.4.3.4 Facteurs de restriction cellulaire

La réplication du VIH et d'autres rétrovirus peut être restreinte au niveau intracellulaire par des facteurs hôtes, tel qu'APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing complex 3G). APOBEC3G est une enzyme encapsidée lors du bourgeonnement de la particule virale et, suite à l'entrée dans une nouvelle cellule cible, catalyse des mutations dG vers dA dans l'ADN proviral naissant. La protéine accessoire Vif du VIH-1 diminue fortement l'activité d'APOBEC3G en séquestrant l'enzyme dans le cytoplasme et provoquant sa dégradation par le protéasome (Strebel et al., 2009). L'analyse génétique de variant d'APOBEC3G n'a pas permis de mettre en évidence de résistance, au contraire, chez les afro-américains, un allèle du gène est associé à une diminution accélérée du nombre de lymphocytes T CD4 et à progression plus rapide vers la maladie (Piacentini et al., 2009). En revanche le niveau basal d'expression d'APOBEC3G serait plus élevé dans les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) de certains HEPS, et la synthèse d'APOBEC3G

en réponse à l'IFN-α serait plus forte. La cinétique d'infection de ces cellules *in vitro* est ralentie, ce qui pourrait expliquer une réplication limitée du HIV chez ces individus (Piacentini et al., 2009).

# Chapitre 2 La neutralisation du VIH-1

Actuellement aucun traitement ne permet de guérir l'infection par le VIH, seuls des traitements réduisant la charge virale et prolongeant l'espérance de vie des patients sont disponibles, c'est pourquoi la recherche se concentre sur le vaccin prophylactique contre le VIH. Pour la majorité des vaccins disponibles ayant démontré leur efficacité, la présence d'anticorps neutralisants (AcN) est le meilleur corrélat de protection (par exemple pour le virus de la vaccine, de la poliomyélite, ou de la rougeole) (Amanna et al., 2008; Plotkin, 2010). *In vivo*, la réponse humorale contre le VIH-1 est dirigée contre plusieurs protéines virales, néanmoins les AcN sont avant tout dirigés contre le spicule du virus, c'est-à-dire la gp120 (SU) et la gp41 (TM).

## 1 Mécanismes d'action des anticorps

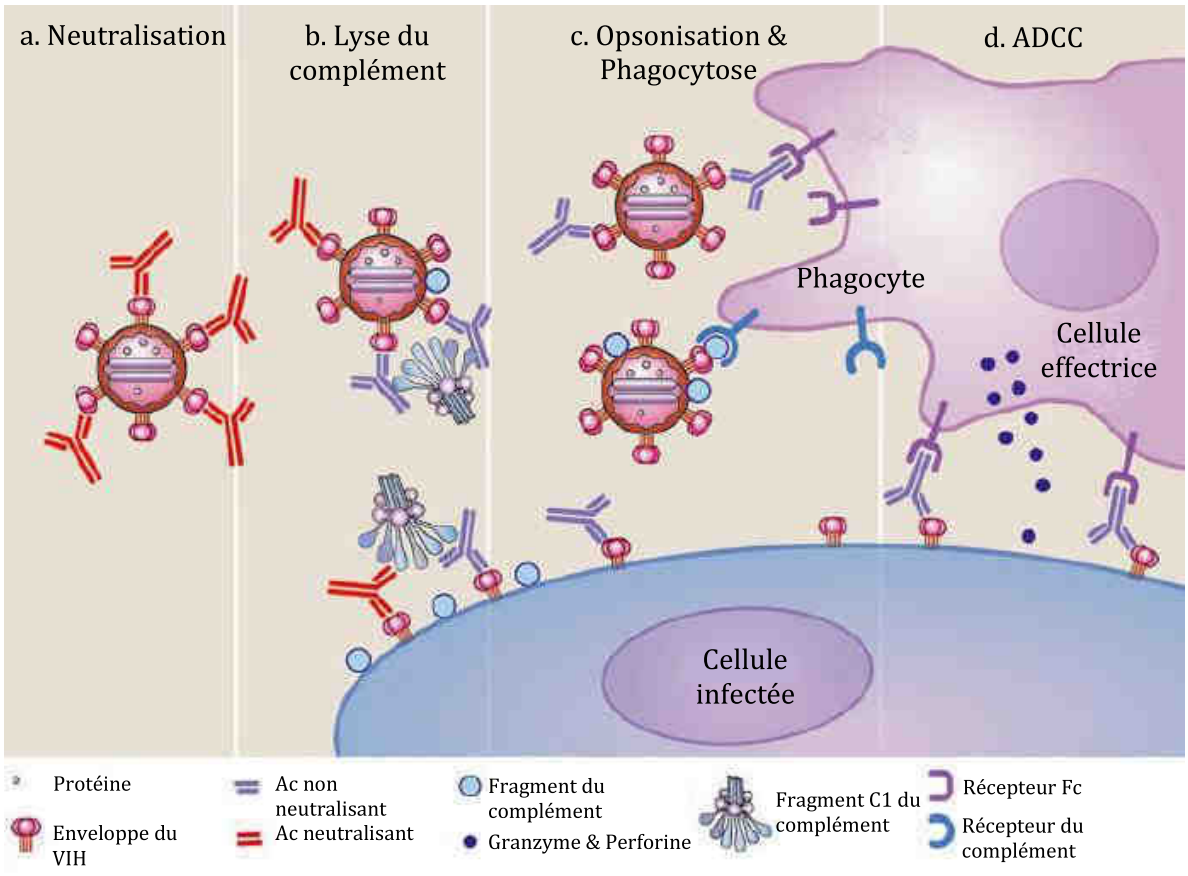



**Figure 7 : Mécanismes d'action des anticorps neutralisants et non-neutralisants sur l'infection par le VIH-1.**

(modifiée d'après Huber et al, 2007)

Toutefois, même si la neutralisation du VIH-1 s'avère être un composant important de la réponse humorale, l'anticorps n'est pas réduit uniquement à une activité neutralisante. L'Ac est une protéine aux fonctions multiples agissant au sein de la réponse immunitaire (figure 7).

## 1.1 La neutralisation

La neutralisation a été définie comme « la perte d'infectivité qui survient lorsque un ou plusieurs anticorps se fixe sur une particule virale, et qui se produit habituellement sans la participation d'aucun autre agent », tels que le complément ou la fixation au récepteur du fragment Fc (Fragment cristallisable) (RFc) de l'anticorps (Burton, 2002). La neutralisation requiert, au minimum, l'interaction entre le paratope situé au niveau du fragment Fab (Fragment *antigen binding*) de l'anticorps avec l'épitope présent sur le virus (figure 7a). La neutralisation est un processus qui n'est que partiellement compris, mais il est admis que le recouvrement du virus par les anticorps est nécessaire et suffisant pour obtenir la neutralisation de la particule virale, et que ce recouvrement empêche la particule virale de se fixer sur sa cellule cible, un effet suffisant mais pas nécessaire pour la neutralisation. En d'autres termes, l'anticorps peut inhiber des évènements survenant après l'attachement comme la fixation au corécepteur ou la fusion du virus (Klasse and Sattentau, 2002).

## 1.2 Le système du complément

Le système du complément, composé de plusieurs protéines, est un élément clé de la réponse immunitaire innée, également capable de faire le lien entre la réponse innée et adaptative. En effet, le complément peut s'activer suite à la reconnaissance d'un pathogène (voie alterne et voie des lectines) ou suite à la reconnaissance d'un anticorps fixé à la surface d'un pathogène ou d'une cellule infectée. La voie classique, la voie des lectines et la voie alterne convergent toutes vers la formation du complexe d'attaque membranaire qui provoque la lyse du pathogène ou de la cellule infectée (Blue, 2004). En plus de son activité de lyse, le complément possède des propriétés d'opsonisation déclenchant la phagocytose et des propriétés de chimiotactisme (Huber and Trkola, 2007) (figure 7b et 7c). Bien que la voie classique du complément joue un rôle important dans la lyse du VIH-1 durant l'infection, certaines études montrent que cette activité est faible pour le VIH-1 comparée à d'autres virus. De plus, le complément pourrait jouer un rôle néfaste en favorisant l'infection des cellules attirées par chimiotactisme telles que les DC, les macrophages ou les lymphocytes T (Blue, 2004; Huber and Trkola, 2007; Stoiber et al., 2008). Lors du bourgeonnement du VIH-1, des protéines cellulaires impliquées dans la régulation du complément comme le CD46 (MCP, Membrane Cofactor Protein) ou CD55 (DAF, complément Decay-Accelerating Factor) sont incorporées dans l'enveloppe de la particule virale, permettant au VIH-1 d'échapper au complément (Stoiber et al., 2008).

## 1.3 Mécanismes liés aux récepteurs Fc des immunoglobulines G

Les récepteurs pour le segment Fc (RFc) des immunoglobulines G (IgG) ou RFcγ sont présents à la surface de diverses cellules du système immunitaire, telles que les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK, mais absent de la majorité des lymphocytes T. Il existe également un récepteur capable de fixer les IgG appelé RFc néonatal, mais ce récepteur ne possède pas les mêmes fonctions que les RFcγ « classiques », et par conséquent ne sera pas détaillé par la suite. Chez l'être humain, cinq RFcγ ont été identifiés : RFcγI (CD64), RFcγIIa (CD32a), RFcγIIb (CD32b), RFcγIIIa (CD16a), RFcγIIIb (CD16b, spécifique des neutrophiles). Ces récepteurs se distinguent par leurs affinités pour les IgG (1 à 4) et les signaux intracellulaires qu'ils déclenchent. Le RFcγIIb est le seul qui transmette un signal inhibiteur via un ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*). Les autres récepteurs, excepté le RFcγIIIb ancré par le GPI, transmettent des signaux activateurs via un ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). L'ITAM est présent dans le domaine cytoplasmique du RFcγIIa, alors que les RFcγI et RFcγIIIa n'en possèdent pas et doivent interagir avec la chaîne γ commune du RFc, ou la chaîne ζ du CD3 (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). L'activité biologique des anticorps liée à l'interaction avec les RFc joue un rôle dans la réponse immunitaire contre le VIH-1 via l'inhibition de la réplication du virus par phagocytose, ADCC ou ADCVI (voir ci-dessous).

### 1.3.1 Inhibition dépendante des RFc

Comme mentionné précédemment, la neutralisation est définie comme la capacité du segment Fab de l'anticorps neutralisant à inhiber l'entrée du virus dans la cellule cible. Néanmoins, l'inhibition de l'infection de cellules présentatrices d'antigènes (APC) par des AcN ne repose pas seulement sur le Fab des AcN, et implique la fixation concomitante du Fab à la particule virale et du Fc aux RFcγ exprimés à la surface de ces cellules (Holl et al., 2004; Holl et al., 2006a; Holl et al., 2006b; Peressin et al., 2011) (figure 7c). Ces études montrent que l'interaction entre le segment Fc et le RFcγ contribue à l'augmentation de l'activité neutralisante des anticorps sur les macrophages (environ 1000 fois) et sur les cellules dendritiques (environ 100 fois) comparé à l'activité mesurée sur lymphocytes T CD4 n'exprimant pas les RFcγ. L'inhibition observée sur les macrophages repose principalement sur la participation du RFcγI (Holl et al., 2004), alors que les RFcγII sont impliqués dans l'inhibition observée sur cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) (Holl et al., 2006b) ou cellules de Langerhans (Peressin et al., 2011). De plus, cette activité dépendante des RFcγ est également observée avec certains anticorps non-neutralisants, alors nommés anticorps non-neutralisants inhibiteurs (AcNNI) (Holl et al., 2006a; Peressin et al., 2011). Certains AcNNI ont démontré une activité de même ampleur que les AcN

sur ces cellules exprimant les RFcγ (Holl et al., 2006a). Ce mécanisme d'inhibition dépendant des RFcγ serait dû à des processus d'endocytose du VIH-1 par les APC menant à sa dégradation.

### 1.3.2 L'ADCC

La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (*Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) est un mécanisme combinant des composants de l'immunité innée et adaptative. Les anticorps IgG fixés sur l'antigène du pathogène présent à la surface de la cellule infectée, sont reconnus via un RFc par une cellule effectrice de l'ADCC, généralement une cellule NK. Cette interaction mène à la destruction de cette cellule par la libération de granules cytotoxiques (granzymes et perforine), de chimiokines, d'oxyde nitrique ou de dérivés réactifs de l'oxygène (figure 7d). Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, des anticorps capables de déclencher l'ADCC se développent chez la majorité des patients infectés et pourraient contribuer à la diminution de la virémie lors de la phase aigüe (Huber and Trkola, 2007). En parallèle, une étude menée sur les contrôleurs élite (virémie indétectable, voir 2.4.3 ci-dessus) a permis de montrer que l'ADCC est significativement plus forte que chez les patients virémiques (Lambotte et al., 2009). Les AcN et les anticorps non-neutralisants peuvent provoquer l'ADCC, permettant une réaction contre les variants autologues et hétérologues du VIH-1. Cependant, les cellules effectrices principales de ce mécanisme, les NK, voient leur activité être détériorée à mesure que la maladie progresse, limitant l'impact de l'ADCC dans le contrôle de l'infection (Huber and Trkola, 2007).

### 1.3.3 L'ADCVI

L'ADCVI (*Antibody-Dependent Cell-mediated Virus Inhibition*) est similaire à l'ADCC puisqu'elle résulte de l'interaction de cellules cibles, d'anticorps, et de cellules exprimant le RFcγ. Néanmoins, l'ADCC se concentre sur la mortalité des cellules cibles, alors que l'ADCVI mesure l'effet global, *in vitro*, des anticorps sur la réplication virale en présence de cellules effectrices. Bien qu'une partie de l'ADCVI soit le reflet de l'ADCC, des effets non-cytolytiques tels que l'inhibition dépendante des RFcγ ou la production de β-chimiokines peuvent jouer un rôle dans l'inhibition du virus (Forthal and Moog, 2009).

## 2 La réponse humorale dans l'infection par le VIH-1

La réponse humorale initiale se met en place vers la troisième semaine après l'infection, sous la forme d'anticorps dirigés contre la gp41, puis contre la gp120. Ces anticorps initiaux sont incapables de neutraliser le virus et ne provoquent aucune pression de sélection sur le VIH (Tomaras et al., 2008), probablement parce qu'ils sont dirigés contre des épitopes immunodominants de formes dénaturées ou non-natives (monomères) de l'enveloppe.

Toutefois, des études montrent que les sérums de patients prélevés très tôt après la séroconversion sont capables d'inhiber la réplication du virus sur les macrophages mais pas sur les lymphocytes (Ruppach et al., 2000). De manière similaire, dans le mois suivant l'exposition, certains patients développent des anticorps générant une ADCVI pouvant probablement contribuer à la diminution de la virémie (Forthal et al., 2001).

Les anticorps capables de neutraliser le virus fondateur (autologue) se développent lentement et ne surviennent qu'environ 12 semaines ou plus après la transmission du VIH. Cette réponse neutralisante est limitée par des vagues successives d'échappement viral à ces anticorps neutralisants autologues (Richman, 2003; Wei et al., 2003). En effet, les AcN d'un individu infecté sont capables de neutraliser les virus isolés précédemment chez ce même individu, mais incapable de neutraliser les variants circulant au moment du prélèvement (Moog et al., 1997). Les mutations permettant au virus d'échapper à la réponse humorale surviennent typiquement sur les boucles variables et incluent la perte ou l'acquisition de site de glycosylation, des substitutions d'acides aminés, et des insertions ou délétions. Ces mutations entrainent une modification des épitopes ou exercent des effets sur l'exposition des épitopes via des changements de structure quaternaire de l'enveloppe (Simek et al., 2009; Wei et al., 2003). Malgré la capacité du virus à échapper à la réponse immunitaire, l'analyse des sérums de nombreux patients infectés par le VIH-1 a permis de montrer que 10 à 25 % de ces individus possèdent des AcN qui réagissent de manière croisée contre diverse souches du VIH-1, et qu'un plus petit groupe (peut-être 10 %) de ces sérums est capable de neutraliser la large majorité des isolats circulants de VIH-1 (Sather et al., 2008; Simek et al., 2009; Stamatatos et al., 2009). Ces AcN hétérologues à large spectre surviennent environ 20 à 30 mois après l'infection (Gray et al., 2011; Mikell et al., 2011; Stamatatos et al., 2009). Cette réponse, observée chez une partie des patients infectés, est d'un intérêt majeur car elle apporte la preuve de concept que la réponse naturelle des lymphocytes B peut générer des AcN de large spectre contre le VIH-1.

# 3 Les anticorps neutralisants *in vitro*

## 3.1 Structure de l'enveloppe

### 3.1.1 La gp120

L'analyse comparative des séquences du gène *env* de divers isolats de VIH-1 a permis d'identifier des segments discontinus de grande variabilité dans la sous-unité gp120. Ces séquences variables sont au nombre de cinq (V1 à V5), espacées de séquences relativement constantes (C1 à C5) (figure 8). Environ la moitié de la masse de la gp120 est composée d'oligosaccharides issus principalement de N-glycosylations, le reste provenant de O-glycosylations (figure 8). De plus,

plusieurs résidus cystéine (en général 18) sont conservés dans la structure primaire de la gp120, assurant la formation de ponts disulfures intramoléculaires cruciaux pour la structure tertiaire de la protéine (Checkley et al., 2011).

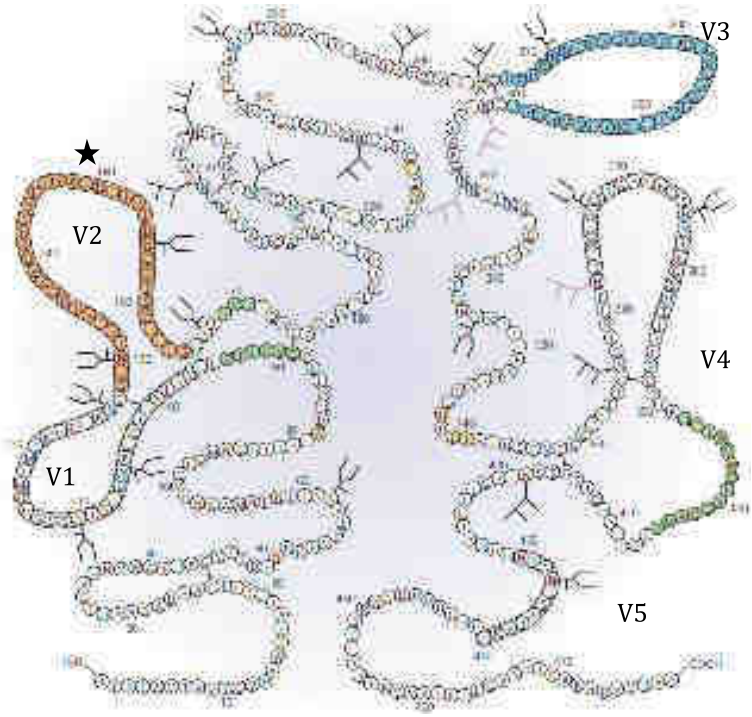



**Figure 8 : Structure primaire de la gp120 avec la position des boucles variables V1 à V5.**
Les structures en branches représentent les glycosylations. L'épitope clé du site de fixation au CD4 est en jaune, le site induit par la fixation du CD4 est en vert, l'épitope glycannique en violet, la boucle V2 en orange (avec le site de fixation à l'intégrine α4β7 représenté par une étoile), et la boucle V3 en bleu (modifiée d'après Zolla-Pazner et al, 2004).

Plusieurs études ont analysé la structure tertiaire de la gp120 monomérique par le biais d'analyse cristallographique (Huang, 2005; Kwong et al., 1998; Pancera et al., 2009; Wyatt et al., 1998), et sur la structure de la gp120 au sein du spicule via la cryotomographie électronique (Harris et al., 2011; Liu et al., 2008; Zhu et al., 2008) (figure 9). Les segments C2, C3 et C4 forme un cœur enfoui et relativement hydrophobe constituant le site de fixation au CD4. La structure tertiaire de la gp120 associée au CD4 est schématisée par un domaine interne, un domaine externe (d'après leur orientation dans le complexe trimérique) relié par petit domaine appelé « bridging sheet » (quatre feuillets β antiparallèles), et ces trois domaines participent à l'interaction avec le CD4 (Pantophlet and Burton, 2006). Le site de fixation au corécepteur est situé au niveau du « bridging sheet » et de la boucle V3. En l'absence du CD4, les boucles V1/V2, situées au niveau du « bridging sheet », masquent le site de fixation au corécepteur situé sur la gp120 voisine du trimère (Rusert et al., 2011). Après la fixation du CD4, la gp120 subit d'importants changements conformationnels (Checkley et al., 2011). En effet, suite à la fixation du CD4, les boucles V1/V2 situées au niveau du « bridging sheet » vont se déplacer et libérer la boucle V3 et le site de fixation au corécepteur (figure 9d) (Harris et al., 2011; Huang, 2005; Liu et al., 2008). La boucle V3 interagit alors avec le corécepteur permettant un rapprochement du

« bridging sheet » au corécepteur (Huang et al., 2007). Ces évènements vont maintenir l'enveloppe à proximité de la membrane cellulaire et faciliter la fusion par la gp41.

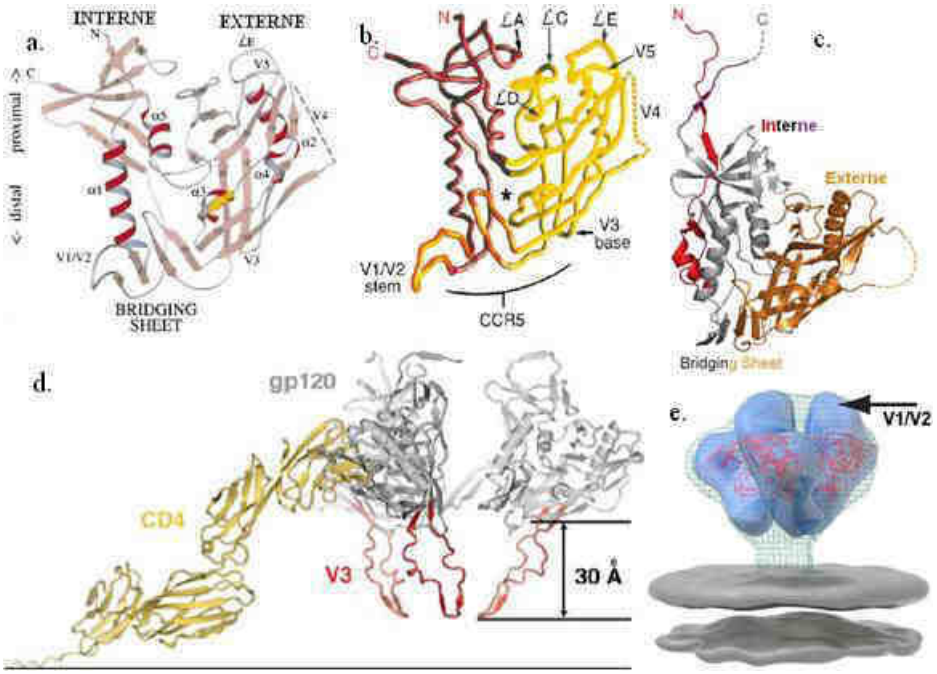



**Figure 9 : Structure de la gp120.**

a. orientation de la protéine et représentation des boucles variables (d'après Kwong et al, 1998) ; b. site de fixation du CD4 (étoile) et site de fixation au corécépteur (CCR5) (d'après Wyatt et al, 1998) ; c. extrémités N-terminale et C-terminale de la gp120 (d'après Pancera et al, 2010) ; d. boucle V3 de la gp120 après fixation au CD4 (d'après Huang et al, 2005) ; et e. structure trimérique de la gp120 (d'après Harris et al, 2011).

### 3.1.2 La gp41

La gp41 est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 345 acides aminés, beaucoup plus conservée que la gp120, organisée en trois domaines majeurs : le domaine extracellulaire (ou ectodomaine), un domaine transmembranaire, et une extrémité C-terminale CT. L'ectodomaine contient les domaines impliqués dans la fusion : une région N-terminale hydrophobe appelée le peptide de fusion, suivie d'une région polaire, deux régions hydrophobes en hélice α appelées N-terminal Heptad Repeat (NHR) et C-terminal Heptad Repeat (CHR), formant une structure en faisceau d'hélices, une boucle issue d'un pont disulfure connectant les deux HR appelée région immunodominante et un domaine riche en résidus tryptophane appelé MPER (*Membrane-Proximal External Region*). Pour le moment, aucune étude n'a été publiée concernant la structure cristallographique de la gp41 entière et native ; seule la structure en faisceau d'hélices des régions HR est disponible et correspond à un évènement postfusion (Montero et al., 2008). Néanmoins, à l'état natif, le trimère de gp41 est considéré comme étant caché sous le trimère de gp120, nécessitant les changements conformationnels issus de la fixation du CD4 et du

corécepteur pour exposer le peptide de fusion qui pénètre la membrane plasmique de la cellule cible. Les régions NHR sur CHR se replient l'une sur l'autre pour former la structure en faisceau d'hélice, menant au rapprochement des deux membranes plasmique et à leur fusion (Checkley et al., 2011).

## 3.2 Anticorps dirigés contre l'enveloppe du VIH-1

Les aspects structuraux de l'interaction entre les AcN et la glycoprotéine gp120, et la compréhension de la structure de l'enveloppe ont permis de mettre en évidence les différentes zones d'antigénicité de la gp120. La gp120 peut être découpée en quatre surfaces : la face non-neutralisante, la face silencieuse, la face neutralisante, et la surface variable (Poignard et al., 2001; Wyatt, 1998). La face non-neutralisante de la gp120 génère une réponse humorale forte chez le patient infecté, mais cette région de la gp120 n'est accessible que sur le monomère libre, et, au contraire, est dissimulée au sein du trimère de l'enveloppe. Les anticorps dirigés contre cette face sont alors incapables de fixer leur épitope sur un spicule natif. La face silencieuse, nommée d'après sa faible immunogénicité, correspond à la région fortement glycosylée de la gp120. La structure de l'enveloppe montre que cette région est la plus exposée du trimère et que la glycosylation permet de créer un bouclier glycannique masquant d'éventuels épitopes qui pourraient être reconnus. Pour se répliquer, le VIH doit interagir avec ses récepteurs, et pour cela doit conserver et exposer une partie de la gp120 : la face neutralisante. Cette région de la gp120 est la région contre laquelle une majorité d'AcN sont dirigés et représente un point de vulnérabilité de l'enveloppe virale, et bien que le site de fixation au CD4 soit enfoui et peu accessible, ce site est reconnu par certains anticorps (Poignard et al., 2001). La surface variable de la gp120 est représentée par les boucles V1/V2 et V3. Les boucles V1/V2, bien que très variables dans leurs séquences primaires, présenteraient des éléments structuraux conservés susceptibles d'être ciblés par des anticorps neutralisants. Sur la gp120 monomérique, la boucle V3 est très immunogénique et a été considérée comme étant le domaine immunodominant principal de la gp120. En dépit de son recouvrement par les boucles V1/V2 au sein du trimère de l'enveloppe, la boucle V3 est essentielle à l'infection et sa variabilité moindre constitue une cible potentielle pour les anticorps neutralisants (Zolla-Pazner and Cardozo, 2010).

L'identification des anticorps monoclonaux ayant une activité neutralisante a débuté avec des tests de neutralisation *in vitro* utilisant du VIH-1 répliqué de multiple fois sur lignée lymphocytaire (virus adapté à la culture sur lignée de lymphocytes T, TCLA). Dans ces conditions, le virus ne subit aucune pression de sélection et les souches virales obtenues après plusieurs passages diffèrent de celles se multipliant chez un patient. Les virus TCLA sont plus sensibles à la fixation d'un anticorps, et les anticorps alors qualifié de neutralisant étaient en

réalité incapables de neutraliser le virus des patients (Moore, 1995). Par conséquent, l'ensemble des tests visant à déterminer l'activité neutralisante des anticorps ont été menés avec des isolats primaires de VIH-1 provenant de patients et répliqués sur un nombre limité de cycles *in vitro*, soitplus récemment avec des pseudo-virus exprimant des enveloppes représentatives des souches circulantes.

Plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de l'enveloppe du virus ont été décrits pour leurs capacités à neutraliser un large spectre d'isolats primaires du VIH-1 (figure 10).

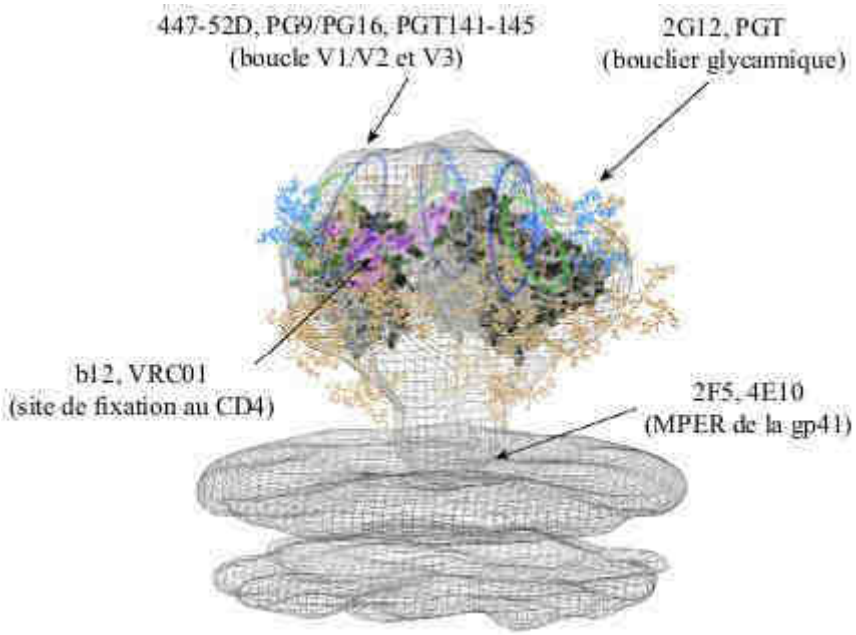



**Figure 10 : Épitope reconnu par les anticorps neutralisants monoclonaux dirigés contre la gp120 et la gp41.**

(modifiée d'après Walker et al, 2010)

- Les anticorps monoclonaux dirigés contre le site de fixation au CD4 :
    - L'anticorps $IgG_1$ b12 est le premier AcN identifié. Il a pu être isolé à partir d'une banque de phages établie à partir des lymphocytes B de la moelle osseuse d'un patient séropositif asymptomatique dont le sérum démontrait une activité inhibitrice sur le VIH (Barbas et al., 1992; Burton et al., 1991; Burton et al., 1994). $IgG_1$ b12 possède un domaine CDR3 allongé sur la partie variable de sa chaîne lourde ($V_H$), et reconnait un épitope conformationnel proche du site de fixation au CD4 via sa chaine lourde uniquement (Burton, 2005; Zhou et al., 2007).
    - L'anticorps VRC01 a été isolé en utilisant une protéine dérivée de l'enveloppe du VIH pour exposer uniquement les résidus impliqués dans l'interaction avec le

CD4. L'utilisation de cette protéine en deux versions fluorescentes, l'une fonctionnelle et l'autre mutée pour ne pas se fixer au CD4, a permis d'isoler des lymphocyte B mémoire réagissant contre le site fonctionnel de fixation au CD4 par tri en cytométrie en flux (Wu et al., 2010). Après le clonage des gènes des chaines lourdes et légères des immunoglobulines, la caractérisation de l'anticorps VRC01 montre un mimétisme de sa chaîne lourde avec le CD4 et l'absence de domaine CDR allongé (Zhou et al., 2010).

- Les anticorps monoclonaux dirigés contre le bouclier glycanique

    - L'anticorps monoclonal 2G12 a été isolé à partir de lymphocytes B de patients séropositifs (Buchacher et al., 1994; Trkola et al., 1996). Cet anticorps reconnait un groupe de mannose conservé à la base des boucles V3 et V4 de la gp120 (Sanders et al., 2002). La structure de cet anticorps est inhabituelle puisque les domaines variables des chaînes légères ($V_L$) ne participent pas à la fixation de l'épitope et se dissocient des domaines $V_H$, permettant aux deux $V_H$ de se rapprocher et de pointer verticalement vers l'épitope (Calarese, 2003). De plus, 80 à 100 % des anticorps 2G12 forment une structure dimérique (Calarese, 2003; West et al., 2008). En ciblant des résidus glycanniques de la gp120, 2G12 serait également en mesure d'inhiber l'interaction du virus avec des récepteurs alternatifs du VIH-1 comme les lectines de types C (Hessell et al., 2009b).

    - Les anticorps PGT ont été isolés pour leurs capacités à neutraliser des isolats primaires du VIH-1, suite à un criblage fonctionnel des immunoglobulines produites par les lymphocytes B mémoires de quatre patients élites contrôleurs (Walker et al., 2011). Les anticorps PGT sont au nombre de 17 dont 12 reconnaissent des épitopes glycanniques. Ces AcN se lient à la gp120 et entrent tous en compétition avec l'AcN 2G12. Exceptés les Ac PGT 135-137, tous reconnaissent un épitope contigu de la boucle V3. En particulier, PGT 127 et 128 se lient aux glycanes en N301 et N322 de la gp120, ainsi qu'à un segment C-terminal de la boucle V3 (Pejchal et al., 2011).

- L'anticorps monoclonal 447-52D est dirigé contre la boucle V3 de la gp120. La boucle V3 est peu accessible sur le spicule natif, toutefois l'anticorps 447-52D reconnait le motif GPGR très conservé à l'extrémité de la boucle V3 des virus de sous-type B, lui permettant de neutraliser un spectre de virus bien plus large que n'importe quel autre anticorps dirigé contre cette boucle (Binley et al., 2004).

- Les anticorps dirigés contre la région MPER de la gp41 du VIH-1 : Le MPER est un domaine conservé de la gp41 et est nécessaire pour la fusion (Montero et al., 2008). Les AcN 2F5 et 4E10 sont dirigés contre le MPER sur deux épitopes linéaires adjacents (ELDKWA et NWFDIT respectivement), et possèdent également un long domaine CDR3 sur la chaine $V_H$ (Montero et al., 2008; Zwick et al., 2001). Le mécanisme de neutralisation n'est pas complètement élucidé pour ces deux anticorps : ils n'empêchent pas la fixation de l'enveloppe sur ses récepteurs mais ils bloquent le processus de fusion (Montero 2008). 2F5 et 4E10 ne seraient pas capable d'interagir avec leurs épitopes avant que la particule virale ne se fixe à son récepteur (Montero et al., 2008). Par ailleurs, les anticorps dirigés contre le motif hydrophobe MPER sont capables de reconnaitre les composants lipidiques et de tels anticorps sont détectés chez des patients possédant une réactivité contre les lipides de la membrane, comme la cardiolipine. Une telle auto-réactivité peut entraver le développement d'une réponse humorale dirigée contre le MPER (Haynes, 2005).

- Les anticorps dirigés contre des structures quaternaires de la gp120

    - Les anticorps PG9 et PG16 ont été isolés pour leurs capacités à neutraliser des isolats primaires du VIH-1, suite à un criblage fonctionnel des immunoglobulines produites par les lymphocytes B mémoires d'un patient infecté par un virus de sous-type A. Les AcN PG9 et PG16 reconnaissent un épitope quaternaire sur le trimère de la gp120 constitué d'acides aminés localisés dans les boucles V1/V2 et V3 de la gp120. Ces deux anticorps, issus de variants somatiques, présentent une région CDR3 sur la chaîne $V_H$ longue (28 acides aminés) (Walker et al., 2009).

    - Les anticorps PGT141-145 sont des AcN monoclonaux mis en évidence en même temps que les AcN PGT reconnaissant des épitopes glycanniques. Les AcN PGT141-145 ne se fixent pas efficacement à la gp120 monomérique, et n'entrent pas en compétition avec l'AcN 2G12. En revanche, PGT141-145 se fixent à l'enveloppe virale liée à la membrane et entrent en compétition avec l'AcN PG9 suggérant qu'ils reconnaissent un épitope similaire (Walker et al., 2011).

L'analyse des sérums de patients infectés dans le but d'isoler de nouveaux AcN à large spectre est nécessaire pour comprendre quels sont les points de vulnérabilité communs à l'ensemble des sous-types du VIH-1. Bien que les patients présentant des AcN à large spectre ne parviennent pas à éliminer le virus ou ne contrôlent pas leur virémie, il est important de distinguer ce manque apparent de bénéfices cliniques des AcN pendant la phase chronique de l'infection, du

rôle potentiellement protecteur de tels AcN sur le virus transmis s'ils sont présents au moment de la transmission du VIH-1.

# 4 Transfert passif d'anticorps *in vivo* dans les modèles de primates non-humain

Afin d'évaluer l'importance de la présence d'AcN au moment de la transmission, de nombreuses études ont été menées sur le modèle d'infection animale et ont permis de montrer que l'immunisation passive de primates non humains avec des AcN anti-VIH-1 protège efficacement ces animaux de l'infection par un virus SHIV (virus chimérique SIV/VIH, réplicatif chez l'animal et exprimant l'enveloppe du VIH-1). Les premiers essais ont utilisé la voie intraveineuse pour administrer le virus, et dans ces conditions, de très fortes concentrations d'AcN sont requises pour protéger l'animal (Mascola et al., 1999; Shibata et al., 1999). Puis, la protection par les AcN a été démontrée dans le cas d'une unique dose de virus capable d'infecter l'animal par voie orale (Baba et al., 2000; Ferrantelli et al., 2003) ou vaginale (Mascola et al., 2000; Parren et al., 2001). Cependant des concentrations élevées en AcN sont nécessaires à la protection des animaux puisque ces modèles d'études utilisent de fortes doses de virus dans le but d'infecter avec certitude les animaux contrôles. Les concentrations en inoculum sont souvent plus faibles lors d'une infection naturelle par voie muqueuse, et les concentrations en AcN nécessaire à la protection pourraient de ce fait être surestimées. Afin de mieux mimer une infection naturelle et d'évaluer concentrations en AcN requises pour protéger contre l'infection, un modèle d'infection par exposition multiple à de faibles doses de virus a été utilisé pour infecter les animaux (Hessell et al., 2009a; Hessell et al., 2009b). Ce modèle d'exposition répétée à de faible dose de virus a permis de montré que des concentrations 10 fois inférieures en AcN b12 (Hessell et al., 2009a) et 2G12 (Hessell et al., 2009b) permettent de protéger les animaux d'une infection par voie vaginale, comparé aux concentrations requises lors d'infections expérimentales avec une forte dose de virus.

D'autre part, la participation des RFc dans l'immunisation passive des animaux a été étudiée avec l'AcN b12 et deux versions mutées de b12 incapables de fixer le complément (KA) ou incapable de fixer le complément et les RFc (LALA) (Hessell et al., 2007). Les anticorps b12 et KA ont protégé de manière équivalente les animaux, tandis que LALA n'a permis de protéger que la moitié des animaux, démontrant que l'interaction de la portion Fc de l'anticorps avec les RFc participe à la protection de l'infection. Ces résultats ont été confirmés dans le modèle d'infection par expositions répétées à de faible dose de virus (Hessell et al., 2009a).

# 5 Rechercher un vaccin

En dépit des efforts menés en matière de prévention de l'infection par le VIH-1, l'épidémie continue, et un vaccin prophylactique permettrait d'enrayer la pandémie. Idéalement, un vaccin contre le VIH devrait prévenir l'infection de l'individu, c'est-à-dire procurer une immunité stérilisante. Cependant, les vaccins contre d'autres pathogènes ne sont pas capables de prévenir l'infection, et permettent quelques cycles de réplications avant le déclenchement de la réponse immune induite par la vaccination. Les vaccins « classiques » mènent à l'éradication du pathogène avant que les symptômes ne surviennent (Mascola and Montefiori, 2010). Cette éradication est possible, car à l'inverse du VIH-1, ces pathogènes ne s'intègrent pas génétiquement dans la cellule hôte. De ce fait, la possibilité d'un vaccin sous-optimal qui n'empêche pas l'infection mais permet de contrôler de manière partielle la virémie et diminue les séquelles immunologiques est souvent mise en avant (Barouch, 2008) (figure 11).

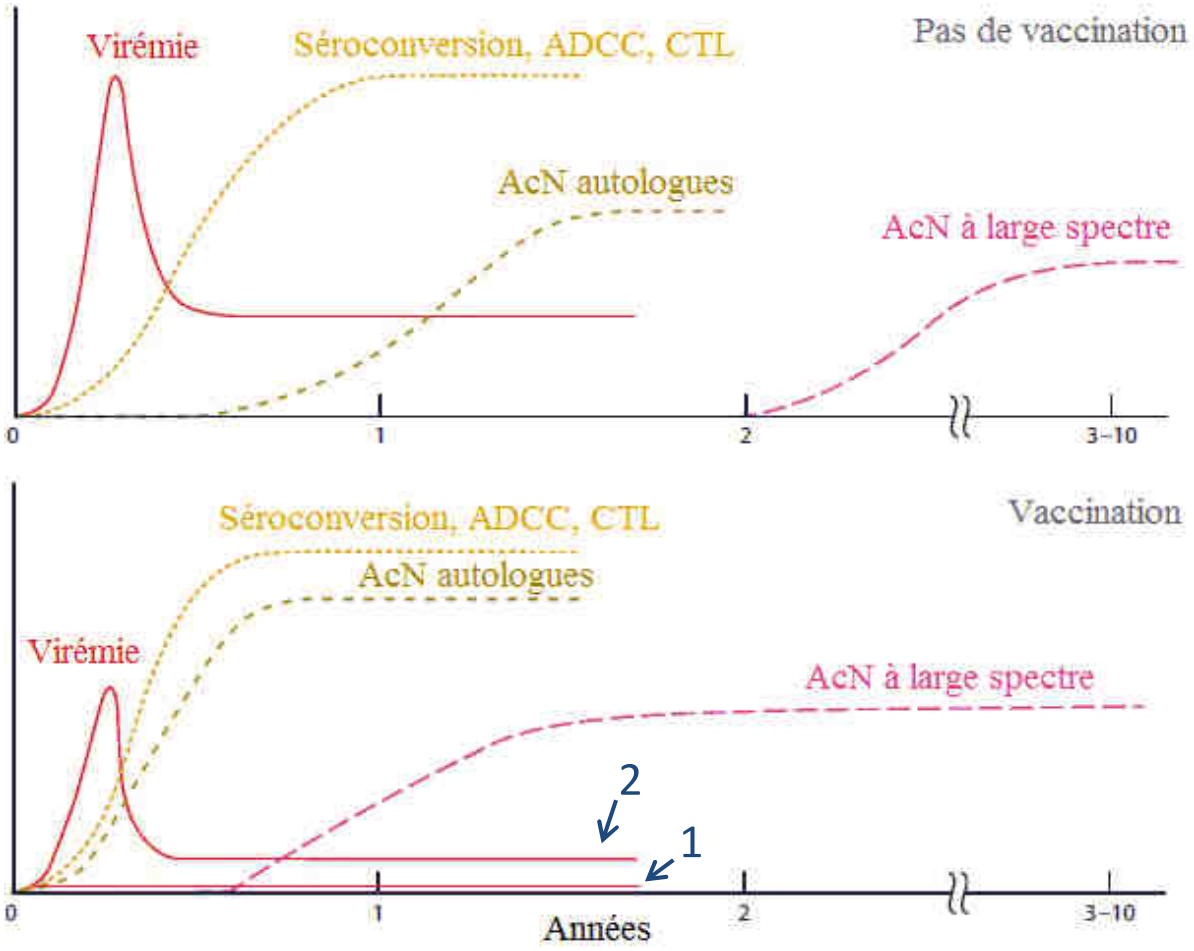



**Figure 11 : Stratégie vaccinale contre le VIH-1.**

Un vaccin contre le VIH-1 pourrait soit (1) inhiber tout réplication virale (vaccin stérilisant) soit (2) inhiber en partie la réplication du virus, offrant un meilleur contrôle de l'infection et limitant la progression vers la maladie (modifiée d'après Mascola et al, 2010).

## 5.1 Les essais vaccinaux

Les efforts pour développer un vaccin contre le VIH-1 se sont d'abord concentrés sur la réponse humorale induite par des sous-unités protéiques, puis ont été reportés plus tard sur l'induction d'une réponse cellulaire via un éventail de protéines virales (Burton, 2002). Les premiers essais vaccinaux se sont concentrés sur l'induction d'une réponse humorale spécifique de l'enveloppe en utilisant la sous-unité gp120. Les options étant limitées, ces immunogènes étaient des monomères de gp120 (ou de gp160) provenant de virus TCLA, aussi les anticorps induits neutralisaient ces virus TCLA mais étaient inefficaces contre des isolats primaires de VIH-1. L'utilisation de gp120 de virus de sous-type B (AIDSVAX B/B) ou de sous-type B et E (AIDSVAX B/E) n'a pas permis de protéger les individus vaccinés dans les essais VaxGen de phase III (protection contre l'infection par le VIH-1). De même, les individus présentaient des AcN contre les virus possédant l'enveloppe utilisée dans l'essai, mais aucune de ces réponses humorales n'a généré d'AcN capables d'inhiber des isolats primaires du VIH-1 (Mascola and Montefiori, 2010). Ces échecs ont orienté les recherches vers une stratégie de vaccination capable d'induire une réponse cellulaire pour plusieurs raisons : l'émergence de la réponse des lymphocytes T CD8 coïncide avec le contrôle de la virémie en phase aigüe (voir 2.4.1 ci-dessus), le niveau élevé de la réponse cellulaire chez les LTNP associée aux allèles spécifiques du HLA (voir 2.4.3 ci-dessus), et la perte du contrôle de la virémie dans le modèle animal suite à la déplétion des lymphocytes T CD8 (Barouch, 2008). Plusieurs vecteurs viraux ont été créés en associant le gène d'enveloppe aux gènes pol, gag et/ou nef pour induire une réponse cellulaire contre ces antigènes viraux. Ces vecteurs basés sur le virus de la vaccine (NYVAC pour New York strain of Vaccinia, MVA pour Modified Vaccinia Ankara), le virus canarypox (ALVAC) ou l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) ont induit une réponse cytotoxique spécifique du VIH mais une réponse humorale faible ou inexistante (Mascola and Montefiori, 2010). Cette stratégie a été employée dans l'essai STEP (mené par MERCK) utilisant le plus efficace de ces vecteurs viraux : le vecteur non-réplicatif Ad5 recombinant (rAd5) exprimant les gènes gag, pol et nef du VIH-1. Les essais cliniques montraient une réponse cellulaire chez la plupart des sujets, bien que cette réponse soit partiellement supprimée chez les individus ayant des anticorps préexistant anti-Ad5. L'essai STEP a été brutalement stoppé lorsque les analyses intermédiaires ont révélé que ce vaccin ne permettait pas de protéger de l'infection et que l'infection par le VIH-1 était plus fréquente chez les individus vaccinés possédant des anticorps préexistant anti-Ad5 que chez les individus contrôles (Barouch, 2008).

L'administration de ces mêmes types vecteurs suivie par l'administration d'une protéine d'enveloppe (ou d'un vecteur viral hétérologue) a généré, en plus de la réponse cellulaire, une réponse humorale très rapide avec un titre fort. Ce protocole de vaccination, nommé « prime-

boost », a été utilisé dans l'essai RV144 (connu sous le nom d'essai « Thai ») utilisant un vaccin canarypox recombinant codant pour gag, pol, nef et la gp120 (ALVAC) suivie par l'administration de gp120 AIDSVAX B/E (utilisées lors des essais VaxGen). Les résultats montrent une efficacité modérée puisque le risque de d'infection par le VIH-1 a été réduit de 31 % pour les volontaires vaccinés comparé aux individus ayant reçu un placebo (Mascola and Montefiori, 2010). Néanmoins, ces résultats constituent une avancée majeure, puisque, pour la première fois, une stratégie vaccinale contre le VIH-1 a permis une protection, même partielle, contre l'infection. L'analyse d'échantillons prélevés deux semaines après la fin de l'immunisation a permis de montrer que la capacité des anticorps IgG à se fixer sur les boucles V1/V2 de l'enveloppe du VIH-1 est inversement corrélée avec l'acquisition de l'infection ; et que la capacité des anticorps IgA sériques à se fixer sur l'enveloppe du VIH-1 est directement corrélée avec l'acquisition de l'infection (Haynes et al., 2012).

## 5.2 Les stratégies futures

Les recherches se poursuivent dans le but d'élaborer un vaccin capable de protéger un plus grand nombre d'individus contre l'infection, en s'inspirant des échecs précédents et des résultats positifs de l'essai RV144. Le développement d'une stratégie vaccinale efficace se concentre désormais sur le protocole prime-boost.

La conception d'immunogène de l'enveloppe est un axe prépondérant dont l'objectif serait de produire des trimères natifs stables de l'enveloppe. L'analyse des sérums de patient a permis de mettre en évidence des AcN à large spectre et les études cristallographiques révèlent les points de vulnérabilité de l'enveloppe du virus. Ces données devraient être utilisées pour la conception d'immunogènes dirigeant la réponse humorale contre ces épitopes (Walker and Burton, 2010). Les études menées sur les sérums contenant des AcN se focalisent trop souvent sur des individus infectés par le sous-type B du VIH-1, et il existe une forte variabilité (environ 35 %) dans la séquence génétique de l'enveloppe entre sous-types. Etendre les études à différent sous-types pourrait permettre d'identifier plus précisément les épitopes vulnérables du VIH-1 (Barouch, 2008).

Pour induire une réponse humorale neutralisante contre le VIH-1, il est également nécessaire de comprendre le fonctionnement des lymphocytes B. En effet, l'analyse des AcN à large spectre a révélé la présence d'au moins une de ces caractéristiques : (i) une polyréactivité (et/ou autoréactivité), (ii) une région $V_H$ CDR3 allongée et hydrophobe (ou chargée), et (iii) un nombre de mutations somatiques très élevé (McElrath and Haynes, 2010). Les deux premières caractéristiques sont associées à la sélection négative des lymphocytes B, empêchant la survenue de réaction auto-immune dans le premier cas, et sont probablement, en partie, à

l'origine de la rareté des AcN. L'AcN VRC01, récemment mis en évidence, ne présente ni auto-réactivité, ni particularité dans la région $V_H$ CDR3, mais comporte de nombreuses mutations somatiques (Verkoczy et al., 2011). Comprendre les mécanismes menant à l'émergence et au maintien des lymphocytes B ayant ces caractéristiques pourrait permettre de les reproduire dans le but d'induire des AcN à large spectre.

L'utilisation de vecteurs adénovirus se porte désormais sur des sérotypes ayant une prévalence plus faible dans la population comme les Ad26 ou Ad35. Les efforts sont également dirigés vers les poxvirus comme ALVAC, MVA ou NYVAC (McElrath and Haynes, 2010). Les adénovirus et poxvirus stimulent les lymphocytes T CD4 et T CD8 mais cette réponse tend à diminuer après la vaccination, en laissant des lymphocytes T mémoires centraux. Une stratégie récente vise à maintenir des lymphocytes T mémoires effecteurs en utilisant le CMV chez le rhésus macaque (Hansen et al., 2009). Ce vecteur RhCMV, contenant les gènes du SIV, infecte de manière persistante le singe et maintient une réponse spécifique des lymphocytes T CD4 et T CD8 contre le SIV. Il a permis d'empêcher l'installation de l'infection systémique des macaques sans pour autant inhiber l'infection au niveau de la muqueuse. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de protection mis en jeu dans ce modèle et pour déterminer si un tel vecteur serait applicable chez l'homme et efficace dans le cadre du VIH-1.

De manière générale, le développement d'un vaccin capable de prévenir (ou contenir) l'infection et/ou la progression vers le SIDA repose principalement sur l'approfondissement des connaissances concernant la biologie du VIH-1, la réponse immunitaire contre le virus, la conception de nouveaux immunogènes et de nouvelles stratégies vaccinales.

# Chapitre 3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

## 1 Les cellules dendritiques

Le système immunitaire repose sur l'action concertée d'une réponse innée non-spécifique de l'antigène et d'une réponse adaptative spécifique de l'antigène. La réponse innée inclut le système du complément, les cytokines et un ensemble varié de cellules, par exemple les macrophages, les cellules NK ou les cellules dendritiques (DC). Les DC font partie des cellules présentatrices d'antigène (APC) et sont chargées d'initier et de moduler la réponse immunitaire permettant d'établir une mémoire immunologique (Banchereau and Steinman, 1998). Les DC sont issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et sont regroupées en deux catégories : les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) qui sont $CD11c^+$ et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui sont $CD11c^-$. Bien que leurs noms puissent prêter à confusion, plusieurs études montrent que les mDC et les pDC peuvent, toutes deux, provenir des précurseurs communs myéloïdes et lymphoïdes (Wu and Liu, 2007). Les mDC représentent plusieurs sous-types de DC selon leur localisation tissulaire : les cellules de Langerhans présentes au niveau de l'épiderme, les DC interstitielles présentes au niveau du derme ou dans les espaces interstitiels des organes, et les mDC elles-mêmes, présentes dans la circulation sanguine.

Les DC participent à la réponse innée en sécrétant diverses cytokines et chimiokines, et surtout, elles font le lien entre l'immunité innée et adaptative par leur fonction d'APC. En effet, les DC immatures vont capturer des pathogènes grâce à leur forte activité d'endocytose, de macropinocytose, et de phagocytose (Mellman and Steinman, 2001). Ce processus de capture des pathogènes repose sur plusieurs récepteurs présents à la surface des DC. Les pathogènes opsonisés par un anticorps seront reconnu via les RFc. D'autres récepteurs reconnaissant les motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen associated molecular pattern (PAMP) Recognition Receptor* ou PRR) permettent de reconnaitre directement les pathogènes ; ce sont les TLR (*Toll-Like Receptor*), les RLR (*RIG-I-Like Receptor*) ou les CLR (*C-type Lectin Receptor*) comme le récepteur du mannose, le DC-SIGN, ou la langerine. Les antigènes ainsi capturés sont entrainés vers les compartiments lysosomaux où se trouvent de nombreuses molécules du CMH (Complex Majeur d'Histocompatibilité) de classe II, et vont être chargés sur ces molécules de CMH de classe II pour être présentés aux lymphocytes T CD4. Parfois, des phénomènes de présentation croisée surviennent et ces mêmes antigènes sont chargés sur des molécules de CMH de classe I, permettant de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8. Les pathogènes et/ou les signaux pro-inflammatoires vont conduire à la maturation des DC, à la

réduction de leur activité de phagocytose et à l'expression de molécules de co-stimulation (telles que le CD80 ou le CD86). Les DC migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont initier les réponses immunitaires en présentant les déterminants antigéniques par le CMH aux lymphocytes T (Banchereau and Steinman, 1998).

# 2 Les cellules dendritiques et la transmission du VIH-1

Les DC présentes au niveau des muqueuses sont infectées par le VIH-1 et sont capables de transmettre le virion aux lymphocytes T CD4, participant ainsi à la dissémination du VIH-1 dans l'organisme (voir 2.4.1 ci-dessus) (Hladik and McElrath, 2008; Pope and Haase, 2003). L'étude de la transmission du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4 a permis de mettre en évidence deux modes de transmission : le transfert en *cis* et le transfert en *trans*. Une étude propose que ces deux modes de transmission soient séparés dans le temps : dans les premières 24 heures suivant le contact des DC avec le VIH-1, le transfert se fait en *trans* ; et après ce délai, le transfert s'effectue en *cis* (Turville et al., 2004).

## 2.1 Le transfert en *trans*

Le transfert en *trans* est le résultat de la capture du VIH-1 par les DC sans dégradation de la particule virale ni fusion menant à l'infection des DC, suivie par la transmission du virus aux lymphocytes T CD4. La capture du VIH-1 par les DC repose sur les phénomènes de capture de pathogènes précédemment évoqués. Le VIH est fixé par différentes lectines de types C (CLR) comme le DC-SIGN, la langerine ou le récepteur du mannose, présents sur différents types de DC (la langerine étant spécifique des cellules de Langerhans), et la participation de ces CLR a été largement décrite dans le cadre de la transmission du VIH de cellule à cellule (Geijtenbeek et al., 2002; Turville et al., 2002; Wu and KewalRamani, 2006).

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les phénomènes intervenant après la capture du VIH-1 par les DC. Le premier modèle est une métaphore de l'épisode du cheval de Troie, où le virus serait endocyté par les DC, conservé à l'état infectieux dans un compartiment endosomal puis redirigé au niveau de la membrane au moment du contact avec le lymphocyte T CD4 (Kwon et al., 2002)(figure 12A). Néanmoins ce modèle a été contesté car l'utilisation de CD4 soluble (CD4s) a permis d'inhiber le transfert en *trans* entre les DC et les lymphocytes T CD4, suggérant que le virus ne se situe pas à l'abri dans des compartiments intracellulaires (Cavrois et al., 2007) (figure 12B). Un autre modèle, basé sur les deux précédents, a été proposé : les virions seraient présents dans des « replis » ou des « puits » vésiculaires toujours accessibles au milieu extracellulaire mais suffisamment profondément à l'abri pour donner l'impression d'être des

compartiments intracellulaires lors d'observations par microscopie (Yu et al., 2008) (figure 12C).

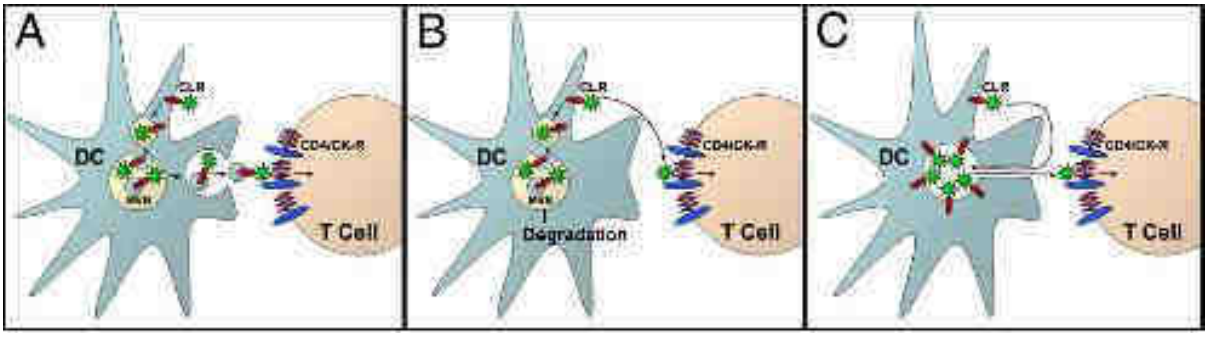



**Figure 12 : Les modèles de transfert en *trans* du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4.**
(A) modèle selon Kwon et al., (B) modèle selon Cavrois et al., et (C) modèle selon Yu et al. (modifiée d'après Yu et al, 2008).

Enfin, la transmission du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4 met principalement en jeu la synapse virologique, terme dérivé de la synapse immunologique. En effet, les DC et les lymphocytes T établissent des synapses immunologiques permettant d'assurer des contacts stables lors de processus immunologiques variés comme la signalisation engageant des récepteurs des deux cellules, ou l'induction de la sécrétion de cytokines, ou la présentation des antigènes. Lors de la transmission du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4, les virions se concentrent au niveau de la surface de contact avec les lymphocytes T, pendant que les récepteurs CD4 et corécepteur CCR5 du VIH-1 se relocalisent à la membrane des lymphocytes T CD4 (Piguet and Sattentau, 2004) (figure 13). Cette jonction forme la synapse virologique. En outre, un second mécanisme de transmission du VIH-1 en *trans* a été décrit, faisant intervenir des exosomes (Wiley, 2006). Le VIH-1 capturé par les DC est rapidement internalisé dans des endosomes avec des corps multi-vésiculaires (ou MVB), puis le virus est relâché dans le milieu extracellulaire en association avec ces corps appelés exosomes (Thery et al., 2002; Wiley, 2006) (figure 13). Bien que ces exosomes puissent être capable de fusionner avec une cellule cible et délivrer du virus infectieux, des études plus approfondies sont nécessaire pour évaluer la participation de ce phénomène dans la transmission du VIH-1 de cellule à cellule.

## 2.2 Le transfert en *cis*

Le transfert en *cis* repose sur l'infection productive des DC et la production de nouvelles particules virales par ces cellules. Bien que l'infection productive des DC par le VIH-1 soit considérée comme moins efficace comparée à l'infection des lymphocytes T CD4, la production *de novo* de virions par les DC contribuerait à la transmission du VIH-1 sur le long terme (Wu and KewalRamani, 2006) (figure 13). En effet, chez les cellules dendritiques dérivées de monocytes

(MDDC), la majeure partie des virions sont dégradés dans les 24 premières heures (Turville et al., 2004), indiquant que le virus transmis après ce délai provient d'une production virale par les DC. Une autre étude montre que le transfert de virions par les MDDC se produit dans les premières heures suivant l'exposition, sans que le virus infectieux ne soit stocké dans ces cellules, et que plus tard les DC produisent du virus et sont capables de le transmettre aux lymphocytes T CD4 (Nobile et al., 2005).

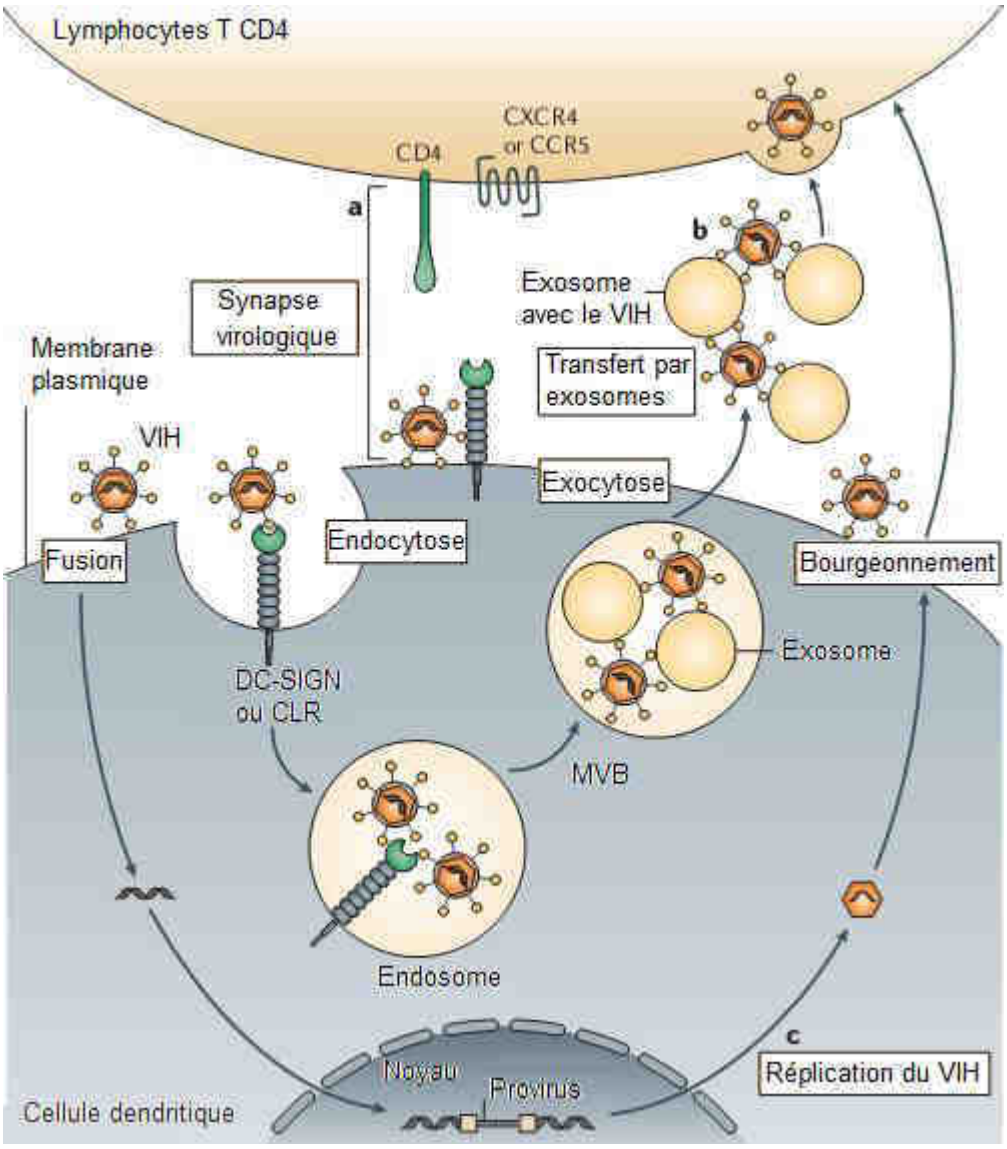



**Figure 13 : Mécanismes de transmission du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4.**
Le VIH-1 est transmis en *trans* au niveau d'une synapse virologique (a) ou via des exosomes (b). Le transfert en *cis* du VIH-1 se produit suite à la réplication du virus dans les DC et la production de nouvelles particules virales (c) (modifiée d'après Wu et al, 2006)

# 3 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

## 3.1 La découverte des pDC

Les pDC ont été nommé différemment au fil du temps et de leur caractérisation phénotypique. En 1958, une observation histologique de cellule à la morphologie de plasmocyte dans la zone T de ganglions lymphatiques leur donna le nom de « cellule associée à la zone T ». Mais en 1983, une étude montrant que ces cellules expriment le CD4 et aucun marqueur des lymphocytes B, elles sont renommées « cellule T plasmacytoïde ». Plus tard, ce nom a été remis en question quand ces cellules se sont avérées ne pas exprimer le CD3, mais exprimer le CMH de classe II ; les pDC s'appelaient alors « monocytes plasmacytoïdes » (Liu, 2005). En 1994, un sous-type de DC $CD11c^-$ est identifié dans le sang périphérique, et ces cellules, après stimulation, augmentent leur expression de CMH de classe II et prennent une morphologie irrégulière commune au DC (Colonna et al., 2004). Puis, des cellules $CD11c^-$ $CD4^+$ $CD45RA^+$ isolées à partir de tonsille ont montré les mêmes caractéristiques que les précédentes DC $CD11c^-$ et correspondait aux « monocytes plasmacytoïdes » ou « cellules T plasmacytoïdes » décrites dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules, désormais nommées pDC, mourraient rapidement en culture si elles n'étaient pas cultivées en présence d'IL-3 (Grouard et al., 1997). En parallèle, une étude menée en 1978 avait mis en évidence qu'une population de cellules sanguines était capable de produire plus d'IFN de type I que n'importe quel autre type cellulaire, sans pouvoir parvenir à l'identifier ; ces cellules sont appelées « cellules productrices d'IFN » (ou IPC). En 1996, une étude phénotypique permet de caractériser les IPC comme étant la même population cellulaire que les pDC, et depuis ces cellules sont regroupées sous la nomenclature pDC, ou parfois pDC/IPC (Liu, 2005).

## 3.2 Le phénotype des pDC

Les pDC sont des cellules rares représentant moins de 0.5 % des PBMC. Plus particulièrement, les pDC sont des cellules $CD3^-$, $CD14^-$, $CD19^-$, $CD56^-$, $CD11c^-$, mais $CD45RA^+$, $CD4^+$, $CCR5^+$, $CXCR4^+$ et $HLA\text{-}DR^+$, et expriment le récepteur de l'IL-3 ($CD123^+$) (Colonna et al., 2004; Grouard et al., 1997; Liu, 2005). Environ 30 à 50 % des pDC expriment le RFcγIIa (ou CD32a) (Bave et al., 2003). Les pDC expriment deux molécules appelées BDCA-2 et BDCA-4 (*Blood Dendritic Cell Antigen*). Ces deux molécules sont ciblées pour la purification des pDC (Dzionek et al., 2000). BDCA-2 est une lectine de type C spécifique des pDC, à la différence de DCIR (*Dendritic Cell Immunoreceptor*) qui est présente à la fois sur les pDC et d'autres DC.

## 3.3 Le développement des pDC

Les pDC se développent dans la moelle osseuse, et expérimentalement elles peuvent être dérivées à partir des progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes. Le développement des pDC et des mDC à partir de ces progéniteurs à l'aide du Flt-3L (*Fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand*) suggère l'existence d'un progéniteur commun des DC. Les pDC sont clairement distinctes des mDC et montrent plusieurs caractéristiques lymphocytaires, telle qu'une morphologie proche des plasmocytes, un temps de vie plus long que les mDCs. De plus, les pDC partagent des caractéristiques moléculaires avec les lymphocytes B, comme l'expression du transcrit pIII du transactivateur du CMH de classe II (CIITA), l'expression continue du CMH de classe II même après leur activation, et une voie de signalisation intracellulaire associée à BDCA-2 similaire à celle retrouvée au niveau du BCR (*B cell Receptor*). Enfin, les pDC expriment des gènes retrouvés dans le développement des lymphocytes, tels que pre-Tα (pre-T Cell Receptor α) et Rag1/2 (réarrangement des gènes d'immunoglobuline). Plusieurs facteurs de transcription ont été impliqués dans le développement des pDC comme IRF8 (facteur de régulation des IFN), Ikaros ou SpiB (exprimé surtout dans les lymphocytes B), mais le plus intéressant semble être E2-2. En effet, la délétion du facteur E2-2 chez la souris provoque la perte des pDC chez l'animal sans altérer le développement des mDC ou des lymphocytes B. Chez l'être humain, des patients monoallélique pour E2-2 présentent des pDC avec un phénotype aberrant et une faible capacité de sécrétion cytokinique (Reizis, 2010).

## 3.4 Localisation et circulation des pDC

Les pDC sont produites au niveau de la moelle osseuse de façon continue, circulent dans le sang et migrent vers les ganglions lymphatiques, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (GALT) et la rate (Colonna et al., 2004). Les pDC sont présentes en abondance au niveau des zones T des organes lymphoïdes, à proximité des veinules à endothélium épais (HEV) (Grouard et al., 1997). Le passage des pDC dans les organes lymphoïdes à travers les HEV est associée à l'expression du CD62L (L-Selectine), qui reconnait l'addressine PNAd (peripheral lymph node adressin) exprimé par les HEV, et du CCR7 qui réagit aux chimiokines CCL19 et CCL21 produites par les HEV et les cellules stromales de la zone T des organes lymphoïdes (Cella et al., 1999; Penna et al., 2001). Bien que souvent mise en doute, les pDC sont présentes au niveau des tissus périphériques en absence d'activation ou d'inflammation, chez la souris (de Heer, 2004), chez le macaque au niveau des muqueuses (Li et al., 2009). Et, un grand nombre de pDC se retrouvent au site d'inflammation dans les cas d'infections virales (au poumon pour la grippe (GeurtsvanKessel et al., 2008), à la muqueuse génitale pour l'herpès (Lund et al., 2006)), ou dans les cas de maladies auto-immunes/inflammatoires (comme le psoriasis, le lupus érythémateux

disséminé, …) (Lande and Gilliet, 2010). La participation du ChemR1 (Chemokine-like Receptor 1) présent à la surface des pDC pourrait être mise en jeu lors de la migration suite à l'inflammation. En effet, le ligand du ChemR1 est la chémerine, exprimée à l'état inactive par les cellules endothéliales et les fibroblastes, jusqu'à ce qu'un évènement de dégât tissulaire survienne. Les pDC expriment un ensemble de récepteur aux chimiokines, par exemple le CCR2 (récepteur de MCP-1), le CCR5 (récepteur de RANTES, MIP-1α et MIP-1β), et le CXCR3 (récepteur de CXCL9, CXCL10, et CXCL11), mais répondent faiblement aux ligands respectifs. En revanche, les pDC migrent efficacement en réponse au ligand du CXCR4, le SDF-1 produit au niveau des cellules endothéliales du derme et des HEV des organes lymphoïdes (Lande and Gilliet, 2010). Les pDC expriment aussi le CCR6 dont le ligand, MIP-3/CCL20 est produit par les cellules épithéliales lorsqu'elles sont exposées à des virus (Li et al., 2009). De plus, au repos ou pendant l'inflammation, les pDC migrent vers les muqueuses de l'intestin grêle en répondant au CCL25 grâce à leur récepteur CCR9 (Wendland et al., 2007).

## 3.5 Les fonctions des pDC

En tant que DC, les pDC sont en charge de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, en secrétant des cytokines et en réalisant la présentation antigénique.

### 3.5.1 La sécrétion de cytokines, en particulier les IFN de type I

Les pDC produisent de grande quantité de cytokines et en particulier les IFN de type I. Toutes les cellules nucléés sont capable de produire des IFN de type I, mais les pDC sont capables de produire une quantité estimée 10 à 1000 fois plus importante qu'une cellule moyenne, lors d'une activation par un virus (Cella et al., 1999; Siegal, 1999). Les IFN de type I déclenchent une réponse innée antivirale en utilisant les voies de la PKR (Protéine Kinase ARNdb-dépendante), du système 2'-5'A et des protéines Mx. Brièvement, la PKR va phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 et bloquer la traduction d'ARNm dans la cellule ; le système 2'-5'A fait appel à la synthèse de 2'-5'-oligoadénylate par une 2-5A synthétase qui vont stimuler la RNase L qui, à son tour, dégrade les ARNm présent dans la cellule ; enfin les protéines Mx sont des GTPases qui vont inhiber la synthèse d'ARNm pendant la transcription virale (Stark et al., 1998). Les IFN de type I produits par les pDC permettent aussi de stimuler la réponse cytotoxique des cellules NK, d'induire une survie à long terme des lymphocytes T, d'induire la production d'IFNγ et la différenciation $T_h1$, de promouvoir la différenciation et la maturation des mDC (Colonna et al., 2004). De plus, les pDC sécrètent d'autres cytokines comme le TNF-α qui entraîne leur maturation (Decalf et al., 2007), ou l'IL-6, qui en association avec les IFN de type I stimulent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la sécrétion d'immunoglobulines (Jego et al., 2003). Lorsque les pDC sont stimulées par un virus, elles produisent également diverses

chimiokines telle que le CCL2 (ou MCP-1), le CCL3 (MIP-1α), le CCL4 (MIP-1β), le CCL5 (RANTES), ou le CXCL10 (IP-10) permettant de recruter les cellules de l'immunité comme les NK ou les lymphocytes T (Megjugorac, 2003).

La capacité des pDC à établir une réponse antivirale forte est basée sur l'expression des TLR7 et TLR9. Les TLR représentent une famille de molécules transmembranaires conservée contenant un ectodomaine riche en leucines (reconnaissant le PAMP), un domaine transmembranaire et un domaine TIR (*Toll/IL-1 Receptor*), et comptent 10 membres chez l'être humain (TLR1 à TLR10) (Akira and Takeda, 2004). Les pDC expriment uniquement les TLR7 et TLR9, alors que les mDC et MDDC (cellule dendritique dérivée de monocytes) expriment les autres TLR (Jarrossay et al., 2001). Les TLR7 et TLR9, localisés dans les compartiments endo-lysosomaux, sont impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques microbiens. Le TLR7 reconnait les ARN simples brins riches en uridine ou guanosine des virus et les composés synthétiques comme l'imiquimod, le R-848 et les analogues des guanosines. Le TLR9 reconnait les molécules d'ADN simple brin contenant des motifs CpG non-méthylé, retrouvé fréquemment dans le génome des virus et bactéries, et les oligodésoxynucléotides (ODN) à base de CpG. Après fixation de leur ligand respectif, les TRL7 et 9 interagissent avec MyD88 qui contient un domaine TIR et un domaine DD (*Death Domain*) et qui recrutent un ensemble de protéines menant à l'expression des gènes de l'IFN de type I, de cytokines (TNF-α, IL-6) et molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) (figure 14) (Gilliet et al., 2008). La stimulation des pDC avec le CpG-A, qui est retenu au niveau des endosomes précoces, entraîne la production d'IFN de type I via l'IRF7, et l'utilisation du CpG-B, qui traverse rapidement le système endosomal vers les endosomes tardifs et les lysosomes, est responsable de la production des cytokines (TNF-α, IL-6) et de l'expression des molécules de costimulation (CD80, CD86, CD40) via NF-κB (*Nuclear Factor-κ B*), démontrant la régulation spatiale de l'activation de ces gènes (Honda et al., 2005a). Par ailleurs, le processus d'autophagie est impliqué dans la détection du matériel génétique de certains virus présents uniquement dans le cytoplasme (figure 14) (Lee et al., 2007). De manière générale, l'expression des IFN de type I résulte de la phosphorylation de l'IRF3 (IFN Regulatory Factor), exprimé constitutivement dans les cellules, qui va induire la transcription d'IFN-β. L'IFN-β va agir de manière autocrine et paracrine pour stimuler les gènes de l'élément de réponse stimulé par les IFN (ISRE) permettant la synthèse de l'IRF7, qui sera ensuite phosphorylé et mènera à l'expression complète de l'ensemble des gènes d'IFN-α (13 au total chez l'être humain) (Marie et al., 1998; Sato, 2000). La particularité des pDC est l'expression constitutive et forte d'IRF7 qui peut se relocaliser très rapidement au noyau lors d'une stimulation par un virus, et ainsi induire une réponse rapide et complète d'IFN de type I sans que la réplication virale n'ait eu lieu dans ces cellules (figure 14) (Honda et al., 2005b; Izaguirre, 2003).

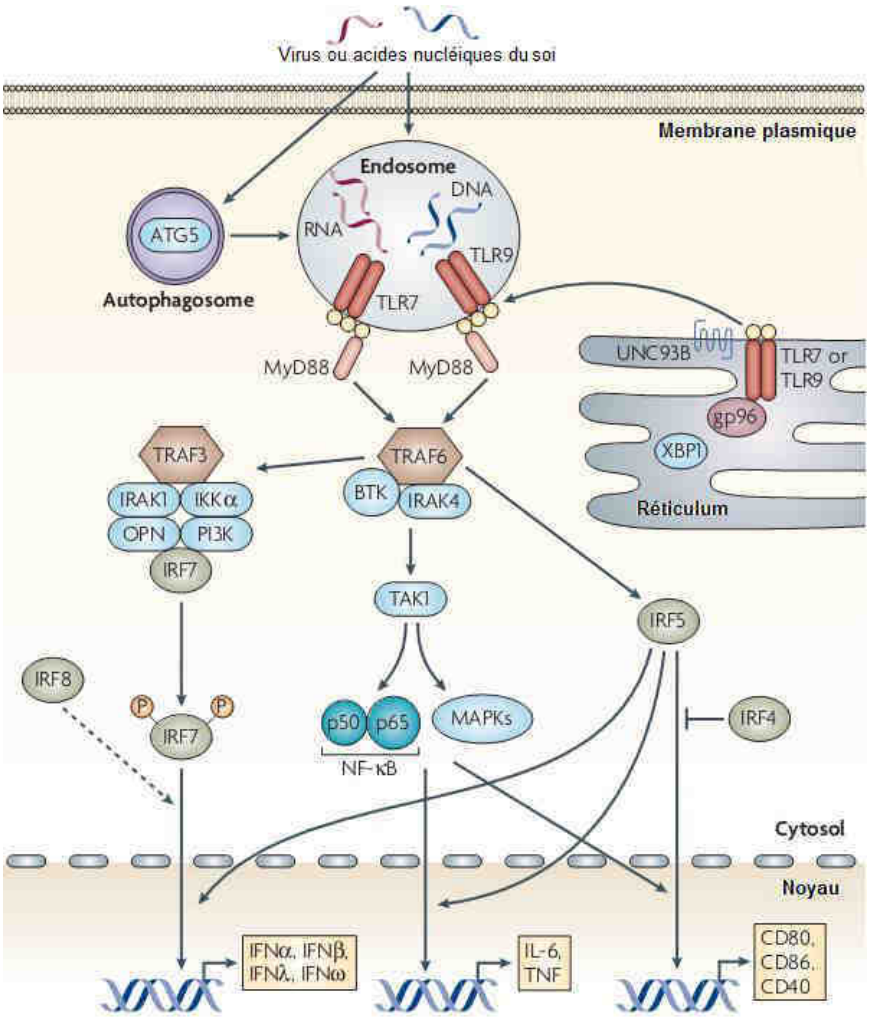



**Figure 14 : Voies d'activation des TLR dans les pDC.**

Les pDC expriment le TLR7 et le TLR9 qui se situent dans le réticulum endoplasmique. Lors de l'exposition à un virus ou des acides nucléiques, les TLR trafiquent vers les endosomes pour interagir avec leurs agonistes (ARN ou ADN). Les TLR déclenchent alors une cascade de signalisation qui active la production d'IFN de type I via le facteur de transcription IRF7 (Interferon-regulatory factor 7), et la production de cytokines comme le TNF ou l'IL-6 ainsi que l'expression de facteurs de costimulation (CD40, CD80, CD86) via les voies NF-κB ou MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Dans ces conditions, les facteurs IRF8 et IRF5 permettent de soutenir cette activation alors que le facteur IRF4 est inhibiteur. Les autophagosomes formés via ATG5 (Autophagy-related gene 5) sont probablement impliqués dans le transfert d'acides nucléiques du cytosol vers les endosomes. BTK, Bruton's tyrosine kinase; IKKα, Inhibitor of NF-κB kinase α; IRAK, Interleukin-1-receptor-associated kinase; MyD88, myeloid differentiation primary-response gene 88; OPN, osteopontin; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase; TAK1, Transforming-growth-factor-β-activated kinase 1; TRAF, Tumour-necrosis factor (TNF) receptor associated factor; XBP1, X-box-binding protein. (modifiée d'après Gillietet al, 2008).

La réponse IFN de type I est toutefois régulée chez les pDC. D'abord, une étude a montré que la stimulation des pDC avec le HSV (*Herpes simplex virus*) ou du CpG est suivie d'une période réfractaire d'au moins 24 heures pendant laquelle les cellules ne produiront plus d'IFN-α en

réponse à une stimulation par un virus ou un agoniste des TLR (Ito, 2006). Ensuite, les pDC expriment plusieurs molécules de surface impliquées dans la modulation de cette réponse. BDCA-2 (lectine de type C spécifique des pDC) est la première à avoir été identifiée dans ce rôle inhibiteur : un anticorps dirigé contre BDCA-2 inhibe la capacité des pDC à produire de l'IFN de type I en réponse aux ligands des TLR (Dzionek et al., 2001). Un autre récepteur spécifique des pDC, ILT7 (*Immunoglobuline-Like Transcript 7*) est impliqué dans l'inhibition de la production des IFN de type I par les pDC (Gilliet et al., 2008). BDCA-2 et ILT7 s'associent tous les deux à la chaîne γ2 des RFc portant un motif ITAM qui relie un signal intracellulaire similaire au BCR impliquant les protéines tyrosine kinases comme Syk. L'activation de cette voie similaire à BCR supprime la production d'IFN de type I en bloquant la voie de signalisation des TLR7 et 9, sans que le mécanisme précis ne soit connu (Cao et al., 2007; Gilliet et al., 2008). De plus, le RFcγIIa (CD32a), présent à la surface des pDC, porte également un motif ITAM, et a été impliqué dans une diminution de la production d'IFN de type I suite à la fixation d'IgG. Néanmoins, lorsque des IgG de patients atteints de lupus érythémateux disséminé sont en complexe avec des acides nucléiques, la fixation des complexes immuns sur les pDC provoque une production d'IFN de type I (Bave et al., 2003). Enfin, un anticorps dirigé contre la lectine de type C DCIR, présente à la surface des pDC, est capable d'induire une diminution modeste des capacités de sécrétion des IFN de type I en réponse à une stimulation des TLR9 (Meyer-Wentrup et al., 2008), peut-être via le recrutement de phosphatases par le motif ITIM de DCIR qui pourraient inhiber la voie TLR9 par déphosphorylation.

### 3.5.2 La présentation antigénique

En plus de leur activité sécrétoire, les pDC activées subissent la maturation caractérisée par des changements phénotypiques, comme l'acquisition d'une morphologie avec dendrites, l'augmentation de l'expression du CMH et des molécules de co-stimulation (CD86, CD40) permettant à ces cellules d'engager et d'activer les lymphocytes T naïfs et mémoires (Colonna et al., 2004; Liu, 2005). Les molécules associées aux pathogènes, ainsi que les signaux inflammatoire vont induire l'accumulation des pDC dans les tissus émettant ces signaux et dans les ganglions drainants. Par exemple, les pDC se relocalisent à la muqueuse vaginale de souris infectées par le HSV-2 (Lund et al., 2006). Les pDC entrent généralement dans les ganglions lymphatiques par le HEV (Grouard et al., 1997), et chez la souris, très peu de pDC semblent migrer du tissu vers les ganglions lymphatiques, sauf dans une phase très tardive de l'infection (GeurtsvanKessel et al., 2008). Les pDC seraient simultanément recrutées au niveau du site d'inflammation et des ganglions lymphatiques afin de créer un environnement pro-inflammatoire via la sécrétion de cytokines et la présentation antigénique.

Plusieurs études ont montré que les pDC présentent les antigènes endogènes efficacement via le CMH I et II, que ces antigènes soient constitutifs ou dérivés de virus infectant les pDC (Fonteneau et al., 2004; Young et al., 2008). Ces études confirment que la machinerie de présentation des pDC est fonctionnelle et produit des molécules de CMH I et II chargées avec des peptides. La présence de peptides endogènes sur le CMH II pourrait être le résultat du mécanisme d'autophagie précédemment mentionné (Lee et al., 2007). Toutefois, les pDC semblent ne pas être efficace dans la présentation de peptides exogènes, à la différence des mDC qui possèdent une forte activité d'endocytose, maintiennent longtemps le complexe peptide-CMH II à leur surface et font la présentation croisée (cross-presentation) permettant de délivrer les antigènes exogènes via le CMH I. Les études menées sur la capacité d'endocytose des pDC sont contradictoires, pour certains ces cellules ne peuvent pas faire la phagocytose (Grouard et al., 1997), alors que des études récentes suggèrent que ces cellules possèdent cette fonction (Hoeffel et al., 2007; Ochando et al., 2006). En revanche, les pDC capturent les protéines solubles efficacement, par des mécanismes de micropinocytose ou via des récepteurs de surface (de Heer, 2004; Young et al., 2008). En effet, plusieurs études ont montré qu'un anticorps couplé à un antigène et dirigé contre les lectines de type C comme BDCA-2 ou DCIR, provoque l'endocytose du complexe lectine-anticorps-antigène, la transformation et la présentation de cet antigène (Dzionek et al., 2001; Jaehn et al., 2008; Meyer-Wentrup et al., 2008). De même, la fixation d'un complexe immun sur le RFcγIIa (CD32a) induit l'internalisation du complexe, et la présentation de ces antigènes par le CMH II (Benitez-Ribas, 2006). A la différence des mDC, la maturation des pDC n'entrainent pas l'inhibition de l'expression de CIITA (MHC Class II Transactivator) permettant à de nouvelles molécules de CMH II d'être synthétisées, entraînant le recyclage des anciennes présentes à la surface de la cellule (Villadangos and Young, 2008). Les pDC ne sont pas capables de maintenir des complexes peptides-CMH II dans le temps (Young et al., 2008), ce qui pourrait leur permettre de continuellement mettre à jour les informations antigéniques pour les nouveaux lymphocytes T arrivant au niveau des sites d'infection ou d'inflammation. Enfin, la capacité des pDC à réaliser la présentation croisée a été mise en évidence dans une étude chez la souris *in vitro* et *in vivo* (Mouries et al., 2008) et chez l'être humain, *in vitro* uniquement, en utilisant des lipopeptides, des corps apoptotiques ou des particules virales (Di Pucchio et al., 2008; Hoeffel et al., 2007).

De plus, plusieurs études montrent que les pDC peuvent induire la tolérance des lymphocytes T, notamment via l'induction de lymphocytes T régulateurs. Chez les souris déplétées en pDC, l'administration d'antigène OVA par voie aérienne déclenche les caractéristiques de l'asthme, alors que les souris non-déplétées développent une tolérance à l'antigène (Goubier et al., 2008). Le potentiel tolérogène des pDC a également été démontré dans un modèle de transplantation cardiaque où la déplétion des pDC, ou le blocage de la migration des pDC vers les ganglions

lymphatiques, a inhibé la génération de lymphocytes T régulateurs et compromis la survie du greffon (Ochando et al., 2006).

# 4 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et le VIH-1

## 4.1 L'infection par le VIH-1 affecte la population de pDC

### 4.1.1 Au niveau du sang

Très tôt lors de l'apparition de l'épidémie de VIH, des études ont montré une forte incapacité des PBMC des patients à produire de l'IFN-α en réponse à une stimulation par le HSV (Lopez et al., 1983; Siegal et al., 1986), et cette incapacité à produire l'IFN-α a été associée avec, et prédictive de la survenue d'infections opportunistes (Siegal et al., 1986). L'identification des pDC comme étant les cellules responsables de la majeure partie de la production d'IFN-α a permis de montrer une déplétion de ces cellules dans le sang périphérique de patients infectés par le VIH-1 (Donaghy et al., 2001; Feldman et al., 2001; Pacanowski et al., 2001; Soumelis et al., 2001). Dans ces études, le nombre de pDC a été corrélé avec le nombre de lymphocytes T CD4 circulants, et/ou inversement corrélé avec la charge virale. En plus de la perte numérique, la capacité des pDC à produire de l'IFN-α chez les patients présentant un très faible nombre de lymphocytes T CD4 (<200/µL) et une virémie élevée était diminuée comparé aux individus non infectés ou aux individus infectés ayant un nombre de lymphocytes T CD4 élevé et une virémie faible (Feldman et al., 2001). Les études portant sur la phase aigüe de l'infection ont également permis de mettre en évidence une diminution du nombre de pDC circulantes (Kamga et al., 2005; Killian et al., 2006; Sabado et al., 2010). Cette dernière étude démontre que la diminution du nombre de pDC dans le sang intervient très tôt dans la phase aigüe de l'infection par le VIH-1 (Sabado et al., 2010). Par ailleurs, les thérapies antirétrovirales (ART) ont certes démontré un effet bénéfique dans la reconstitution du nombre et de la fonction des pDC chez les patients infectés, mais les études divergent sur le degré partiel ou complet de cette reconstitution (Chehimi et al., 2007; Kamga et al., 2005; Killian et al., 2006; Siegal et al., 2001). Les conditions de mise sous thérapie ART pourraient être décisives, les patients ayant reçu un traitement très tôt (Kamga et al., 2005) ou ayant une charge virale faible à l'initiation du traitement (Chehimi et al., 2007) montrent en effet une meilleure reconstitution des pDC. Chez les LTNP, le rôle protecteur des pDC dans la progression de l'infection par le VIH-1 a longtemps été suggéré puisque des taux normaux de pDC circulantes ont été retrouvés chez ces patients (Soumelis et al., 2001). De même, une étude montre que le nombre de pDC circulantes chez les élites contrôleurs est maintenu au niveau de celui retrouvé chez les individus sains, comparé aux individus infectés avec ou sans traitements ART (Machmach et al., 2012). Mais une autre étude observe un taux de pDC circulantes chez les

LTNP et élite contrôleurs inférieur aux individus sain et similaire aux individus infectés progresseurs (Sabado et al., 2010).

### 4.1.2 Au niveau des organes lymphoïdes

L'origine de la déplétion et de la perte de fonctionnalité des pDC circulantes fait l'objet de recherches aux résultats parfois divergents. Pour expliquer la diminution du nombre de pDC circulantes certaines études suggèrent une redistribution rapide des pDC au niveau des organes lymphoïdes comme observé chez les macaques infectés par le SIV (Brown et al., 2009; Malleret et al., 2008) et chez les patients infectés par le VIH-1 (Dillon et al., 2008). Les pDC s'accumulent également au niveau de la rate chez les patients infectés chroniquement par le VIH-1 (Nascimbeni et al., 2009). Bien que les pDC se redirigent vers les organes lymphoïdes secondaires, les études portant sur le devenir de ces cellules présentent des résultats opposés. Certaines études montrent que les pDC sont présentes en nombre égal ou plus important dans ces organes comparé à des individus sains dans le cas du SIV (Malleret et al., 2008) et du VIH-1 (Dillon et al., 2008; Lehmann et al., 2010), et à l'inverse, des études montrent que le nombre de pDC va diminuer dans ces organes aussi bien chez le singe (Brown et al., 2009) que chez l'être humain (Biancotto et al., 2007). Dans le cas du singe, l'apparente diminution du nombre des pDC dans ces tissus est le résultat d'une mobilisation accrue des pDC aux ganglions lymphatiques et de l'augmentation du taux de mortalité des pDC (Brown et al., 2009). Chez l'être humain, une augmentation du taux de mortalité des pDC a également été observée au niveau des ganglions lymphatiques (Lehmann et al., 2010).

La raison de la diminution du nombre de pDC chez les patients virémiques n'est pas encore éclaircie et pourrait être due à un ou plusieurs mécanismes tels que l'exposition des pDC au VIH-1 ou à des cellules infectées par le VIH-1, l'infection des pDC par le VIH-1, ou un effet conséquent à la dérégulation de l'hématopoïèse et du système immunitaire.

## 4.2 Effet du VIH sur l'activité des pDC

### 4.2.1 La production d'IFN-α induite par le VIH-1

#### 4.2.1.1 *In vitro*

La production d'IFN-α par les pDC incubées avec le VIH-1 repose sur un mécanisme d'endocytose amenant la particule virale dans des compartiments endo-lysosomaux, puisque la production d'IFN-α est inhibée par l'utilisation d'inhibiteur de la macropinocytose, d'inhibiteur de l'endocytose par clathrine, et d'inhibiteur de l'acidification des vésicules d'endocytose (Beignon et al., 2005). L'endocytose du VIH-1 et la production d'IFN-α par les pDC est en partie

dépendante de l'affinité de la gp120 pour le CD4, mais pas pour le corécepteur (Haupt et al., 2008; Herbeuval et al., 2005b; Pritschet et al., 2012). Toutefois, en saturant les pDC avec un anticorps anti-CD4, l'endocytose du VIH-1 n'est pas complètement inhibée (Haupt et al., 2008; Pritschet et al., 2012), suggérant la participation d'autres molécules dans la reconnaissance du VIH-1, comme par exemple BDCA-2 qui est capable de fixer la gp120 (Martinelli et al., 2007). La voie qu'emprunte le VIH-1 après endocytose fait actuellement débat, puisqu'une étude montre que du pseudovirus fluorescent (GFP) se trouve préférentiellement dans les endosomes précoces des pDC (O'Brien et al., 2011) alors qu'une autre étude montre que du virus primaire se retrouve autant dans les endosomes précoces que tardifs (Pritschet et al., 2012).

Le traitement des pDC avec un inhibiteur des TLR7 et 9 interrompt la production d'IFN-α en présence de VIH-1 (Beignon et al., 2005; Hardy et al., 2007). Le TLR7 pourrait être prépondérant par rapport au TLR9 dans l'induction de cette réponse IFN-α, comme le suggèrent les expériences de compétition et les essais sur lignées cellulaires exprimant uniquement le TLR7 ou le TLR9 (Beignon et al., 2005). La production d'IFN-α via le TLR7 est probablement favorisée par l'inhibition spécifique de la stimulation du TLR9 par la gp120 (Martinelli et al., 2007). Dans l'étude montrant que le VIH-1 est restreint aux endosomes précoces, l'incubation des pDC avec le virus induit une production prolongée d'IFNα et le développement d'un phénotype partiellement mature, suggérant que la voie NF-κB associée aux endosomes tardifs n'est pas impliquée. Dans ces conditions, la restimulation des pDC avec le VIH-1 provoque la production d'IFNα mais pas la production de TNF-α ou d'IL-6 (O'Brien et al., 2011).

#### 4.2.1.2 *Ex vivo* et *in vivo*

Comme évoqué précédemment, les premières études sur les patients infectés par le VIH-1 ont montré que la stimulation de leurs PBMC avec le HSV ne provoque qu'une faible production d'IFN-α, pouvant être expliquée par la diminution du nombre de pDC circulantes. En effet, plusieurs études montrent que les pDC des patients restent capables de produire de l'IFN-α en réponse à un stimulus des TLR. Chez les patients en phase aigüe de l'infection par le VIH-1, les pDC isolées sont toujours capables de répondre à un agoniste du TLR7 en produisant de l'IFN-α et d'autres cytokines, ainsi qu'en exprimant les marqueurs de co-stimulation (Sabado et al., 2010). Les études menées sur les pDC circulantes de patients infectés en phase chronique montrent que même dans la phase avancée de la maladie, les pDC restent la population de cellules exprimant le plus l'ARNm de l'IFN-α (Lehmann et al., 2008). Les pDC de patients interrompant brièvement leur traitement ART ont une capacité réduite à produire de l'IFN-α en réponse à un agoniste du TLR9 ou à du VIH-1, comparé aux patients restant sous traitement (Tilton et al., 2008). Mais les pDC de ces patients montrent une augmentation de l'expression des gènes de la réponse aux IFN de type I suggérant que cette incapacité des pDC à produire de

l'IFN-α *ex vivo* ne serait pas due à une déficience des cellules mais plutôt à une période réfractaire suite à la stimulation *in vivo* par le VIH-1 (Ito, 2006; Tilton et al., 2008). Dans le modèle pathogène d'infection par le SIV, l'analyse longitudinale des singes montre que 35 jours après l'infection, la production d'IFN-α rapportée au nombre de pDC est fortement diminué quand les cellules sont stimulées avec le HSV ou le SIV. Puis, 9 mois après l'infection, les pDC produisent une quantité d'IFN-α similaire à celle observée avant l'infection en réponse au HSV, mais la reconstitution de cette réponse IFN-α n'est pas totale lorsque les cellules sont stimulées avec le SIV (Malleret et al., 2008).

La production d'IFN-α par les pDC *in vivo* a été évaluée dans différents organes. Dans un modèle de greffe de thymus humain chez la souris, les pDC présentes dans le thymus produisent de l'IFN-α lorsque le VIH-1 est injecté à l'animal (Gurney et al., 2004). Chez des patients infectés, les pDC retrouvées au niveau de ganglions lymphatiques produisent une quantité plus élevée d'IFN-α comparé aux pDC d'individus sains (Lehmann et al., 2010). Dans une étude menée chez les patients infectés et atteints de purpura thrombopénique, l'analyse par microscopie des pDC présentes au niveau de la rate montre que ces pDC ne seraient pas responsables de la majeure partie de la production d'IFN-α dans ce tissu (Nascimbeni et al., 2009). Ces résultats ne sont pas incohérents, puisque, chez la souris, la production de TGF (*Transforming Growth Factor*)-β au niveau de la rate inhibe les pDC activées par un virus, en réduisant notamment leurs fonctions de production d'IFN-α (Li et al., 2008).

### 4.2.2 Effet du VIH sur la production d'autres cytokines et l'état d'activation des pDC

En présence du VIH-1, de nombreuses études montrent que les pDC produisent d'autres cytokines et chimiokines. *In vitro*, les pDC d'individus sains incubées avec du VIH-1 produisent de l'IL-6, du MIP-1α et du TNF-α (Beignon et al., 2005; Fong et al., 2002; O'Brien et al., 2011), sauf dans le cas d'une étude rapportant que l'incubation de pDC avec le VIH ne provoque pas la production de TNF-α (Smed-Sorensen et al., 2005). Chez les patients infectés en phase aigüe, les pDC produisent également ces trois molécules lorsqu'elles sont incubées avec un agoniste des TRL7 ou avec du VIH-1 (Sabado et al., 2010).

L'état d'activation et de maturation des pDC en présence du VIH est plus discuté. Des études menées *in vitro* font état d'une expression forte des marqueurs CD80, CD86 et CD83 (Beignon et al., 2005; Fonteneau et al., 2004; Martinson et al., 2009), quand d'autres ne montrent qu'une expression faible ou modérée de ces marqueurs (Smed-Sorensen et al., 2005), voire même une absence totale de ces marqueurs (O'Brien et al., 2011). Chez les patients en phase aigüe de la maladie, l'incubation des pDC *ex vivo* avec le VIH-1 entraîne une faible expression du CD40, CD86

et du CCR7 à la surface des cellules (Sabado et al., 2010). Les études portant sur les pDC circulantes de patients en phase asymptomatique montrent un niveau de base d'expression du CD86 plus élevé que chez les individus sains (Martinson et al., 2007). Au niveau des ganglions lymphatiques des patients, les pDC expriment plus fortement le CCR7 (responsable de la migration des pDC vers les ganglions lymphatiques) et ces cellules présentent un profil d'activation anormal en exprimant le CD40 mais pas le CD83 ou CD86 (Dillon et al., 2008; Lehmann et al., 2010). En dehors de l'activation des pDC par la stimulation des TLR, une étude a montré que la protéine de matrice du VIH-1 (p17) est capable d'induire, via un récepteur non identifié, l'expression de CCR7 à la surface des pDC sans qu'elles expriment le CD80, CD86 ou CD83 (Fiorentini et al., 2008).

## 4.3 Rôle des pDC dans l'infection par le VIH-1

### 4.3.1 Infection productive des pDC par le VIH-1

Les pDC expriment fortement le CD4, le CCR5 et le CXCR4 à leur surface (Fong et al., 2002; Patterson et al., 2001; Penna et al., 2001). Les études *in vitro* ont permis de montrer la présence du provirus du VIH-1 (Patterson et al., 2001) et la production de la capside du virus (p24) (Smed-Sorensen et al., 2005) dans les pDC incubées avec le VIH-1 de tropisme R5 ou X4. Le surnageant de pDC infectées est capable d'infecter des lymphocytes T CD4 (Schmidt, 2004) ou des lignées susceptibles (Patterson et al., 2001) démontrant que le VIH-1 se réplique dans les pDC. La viabilité des pDC est inaltérée en présence de VIH-1 (Fong et al., 2002). L'infection des pDC par un virus VIH-1 infectieux, un virus VIH-1 AT2 (virus inactivé dont la structure tridimensionnelle reste intègre), ou l'exposition des pDC à l'IFN-α ne provoque aucun effet cytotoxique sur ces cellules et stimule leur métabolisme (Hardy et al., 2007). L'IFN-α est, en effet, capable de permettre la survie des pDC (Ito et al., 2001). En revanche, une étude montre que les pDC entrent en apoptose ou en nécrose lorsqu'elles sont cultivées avec une lignée cellulaire infectée par le VIH-1, via un phénomène dépendant de la fusion des pDC avec ces cellules infectées (Meyers et al., 2007).

*In vivo*, les pDC circulantes isolées à partir de patients infectés par le VIH-1 présentent également le provirus du VIH-1 à une fréquence similaire à celle des lymphocytes T CD4 (Donaghy, 2003). Et, une autre étude démontre que lorsqu'un traitement ART est en place, les pDC du sang ne portent plus le VIH-1, indiquant que les pDC circulantes ne constituent pas un réservoir majeur du VIH-1 (Otero et al., 2003). Toutefois, au niveau de tissus, des pDC infectées par le VIH-1 (positives pour la protéine de capside CA p24) ont été retrouvées dans les tonsilles de patients (Fong et al., 2002). Dans le modèle de thymus humain greffé chez la souris, les pDC sont également infectées de manière productive par le VIH-1 (Gurney et al., 2004).

De plus, les pDC sont capables de transférer le VIH-1 aux lymphocytes T CD4 *in vitro*. Des études ont montré que des pDC, infectées de manière productive par le VIH-1, transfèrent le VIH-1 aux lymphocytes T CD4 (Fong et al., 2002; Lore, 2005), et que ce transfert est plus efficace vers les lymphocytes T CD4 reconnaissant un antigène présenté par les pDC (Lore et al., 2005). De même les pDC provenant du thymus peuvent transférer le VIH-1 aux thymocytes (Evans et al., 2011).

L'ensemble de ces travaux montre que les pDC constituent une population de cellules cibles pour le VIH-1 et que les pDC pourraient participer à la dissémination du virus lors de l'infection.

### 4.3.2 Les fonctions des pDC dans l'infection aigüe et chronique par le VIH-1

L'effet bénéfique ou préjudiciable de la réponse immunitaire mise en place par les pDC tout au long de l'infection par le VIH-1 est controversé. En effet, dès la transmission du virus, le rôle des pDC est ambigu. Les études s'appuyant sur le modèle d'infection du singe ont montré qu'au repos un faible nombre de pDC est présent au niveau des muqueuses. Puis, au moment de la transmission du virus, un nombre important de pDC migre très tôt au site d'infection au niveau de la muqueuse notamment via la forte production de MIP3-α par les cellules épithéliales (Li et al., 2009). Les pDC vont alors produire des IFN de type I aux propriétés antivirales, et des chimiokines comme MIP-1α et MIP-1β qui sont capables de bloquer l'entrée du virus dans les cellules cibles en bloquant le corécepteur CCR5 (Piacentini et al., 2009). La mise en place d'une réponse innée locale rapide et forte est probablement en partie responsable de la faible probabilité de transmission du VIH-1, généralement estimé entre 1 sur 100 à 1 sur 1000 selon la charge virale et le partenaire (Moir et al., 2011). Paradoxalement, cette réponse innée inflammatoire pourrait en même temps faciliter la transmission, puisque les chimiokines comme MIP-1α/β permettent de recruter des lymphocytes T CD4 mémoires (Li et al., 2009). Ce processus transforme la sous-muqueuse en un environnement riche en lymphocytes T CD4, augmentant le nombre de cibles principales du virus et favorisant la transmission cellule à cellule du virus. Cet afflux de cellules de l'immunité facilite également la dispersion locale du virus au-delà du site de transmission. L'augmentation de la susceptibilité à l'infection par le SIV à cause de la présence de cellules cibles en grand nombre au niveau de la muqueuse est aussi retrouvé dans les cas d'ulcération du tissu ou de l'infection par d'autres pathogènes comme le HSV-2 (Haase, 2011).

Le rôle potentiellement néfaste des IFN de type I est souligné par la comparaison des modèles d'infection pathogène et non-pathogène du SIV. Chez les singes verts ou les sooty-mangabey (modèles non-pathogènes) la production d'IFN de type I est forte pendant la phase aigüe, avec une intensité comparable à celle observée chez le macaque (modèle pathogène), toutefois

l'activation de la réponse IFN est rapidement contrôlée dans le modèle non-pathogène alors que cette production d'IFN-α persiste de façon chronique dans le modèle pathogène (Bosinger et al., 2009; Diop et al., 2008; Harris et al., 2010; Jacquelin et al., 2009). Une seule étude portant sur le sooty-mangabey suggère une déficience dans le gène de l'IRF7 dans cette espèce (Mandl et al., 2008), permettant de supposer qu'en absence de production d'IFN-α, l'activation immunitaire ne se produit pas. Mais une étude récente permet de faire une hypothèse différente en montrant qu'à la différence du singe vert, le recrutement accru des pDC aux ganglions lymphatiques avec la mise en place d'un environnement inflammatoire serait associé au développement de la maladie chez le macaque (Campillo-Gimenez et al., 2009). Chez l'être humain, une étude a montré que la production d'IFN-α est associée à la progression de l'infection. Chez les femmes, qui progressent plus rapidement vers la phase SIDA, la stimulation des TLR par des ligands dérives du VIH-1 entraîne une plus forte production d'IFN-α que chez les hommes (Meier et al., 2009), sans que cette différence n'apparaisse pour le TRL9, ou la production de TNF-α. Ces études suggèrent que la production des IFN de type durant la phase aigüe ne serait pas préjudiciable, mais qu'un lien entre la chronicité de la production des IFN de type I et la progression vers la maladie pourrait exister sans démontrer si l'IFN produit est la cause ou la conséquence de cet effet pathogène.

Plusieurs études ont recherché les effets des IFN de type I sur l'ensemble du système immunitaire au cours de l'infection par le VIH-1, aboutissant à des conclusions partagées entre des effets bénéfiques et néfastes.

#### 4.3.2.1 Les effets bénéfiques des pDC sur la réplication virale du VIH-1

Les effets positifs des IFN de type I sécrétés par les pDC reposent principalement sur l'activité antivirale de ces molécules. Une étude a montré, *in vitro*, que les cellules épithéliales peuvent stimuler la synthèse d'IFN-α par les pDC et que l'incubation de ces pDC avec une lignée en contact avec le VIH-1 inhibe l'infection des cellules, suggérant que dès la transmission, les pDC seraient en mesure d'inhiber la réplication du VIH-1 (Rodriguez Rodrigues et al., 2011). Plusieurs études démontrent l'effet inhibiteur de l'IFN-α produit par les pDC sur la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4 (circulants ou tissulaires), puisque le blocage de l'IFN-α avec des anticorps, ou la déplétion des pDC du milieu de culture entraîne une augmentation de la réplication du virus (Audige et al., 2006; Gurney et al., 2004; Schmidt et al., 2005). L'effet antiviral de l'IFN-α est renforcé par l'induction de l'expression du facteur de restriction APOBEC3G (voir 2.4.3.4 ci-dessus) par diverses cellules comme les pDC elles-mêmes, les macrophages ou les lymphocytes T CD4 (Chen et al., 2006; Peng et al., 2006; Wang et al., 2008). Cette stimulation de l'expression d'APOBEC3G par les IFN de type I permettrait d'inverser l'équilibre avec l'activité de dégradation d'APOBEC3G par la protéine virale Vif (Peng et al.,

2006). Chez les patients infectés par le VIH-1, les pDC purifiées sont capables d'inhiber la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4 autologues. L'inhibition induite par les pDC d'individus sains est similaire à celle observée avec les pDC de patients ayant une forte virémie ou ceux sous traitement ART, suggérant que les individus ayant une faible virémie possèdent des pDC qualitativement différentes (Meyers et al., 2007). De même, les pDC des individus élite contrôleurs inhibent plus efficacement la réplication du VIH-1 dans une lignée cellulaire, et induisent une plus forte apoptose de ces cellules infectées, comparé aux pDC des individus virémiques (Machmach et al., 2012).

Plusieurs études ont été menées pour déterminer l'effet de l'administration d'IFN-α sur la progression de la maladie. Dans le modèle pathogène du SIV, l'administration d'IFN-α humain à des macaques n'a pas permis de diminuer le taux plasmatique d'ARN viral (Asmuth et al., 2007). Chez l'être humain, l'administration d'IFN-α a permis de réduire le taux plasmatique d'ARN viral, mais n'a pas eu d'effet bénéfique sur le taux de lymphocytes T CD4 circulants (Skillman et al., 1996). En 1988, des patients en phase asymptomatique ont été traités avec de l'IFN-α, et, récemment, ces travaux ont fait l'objet d'une nouvelle analyse permettant de mettre en évidence une diminution significative du taux plasmatique d'ARN viral sans que le taux de lymphocytes T CD4 ne varie ou que la progression de la maladie soit freinée (Tavel et al., 2010).

Les IFN de type I sont capables d'inhiber la réplication du virus *in vitro* et *in vivo*, mais cet effet ne semble pas suffisant pour enrayer la progression de la maladie.

#### 4.3.2.2 Les effets néfastes des pDC sur les cellules de l'immunité dans l'infection par le VIH-1

En s'intéressant de plus près aux différents effets de l'IFN-α, des études se sont orientées vers la piste de l'apoptose et du TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*). Le TRAIL et ses cinq récepteurs cellulaires constituent un système de régulation des réponses apoptotiques intracellulaires. Brièvement, le TRAIL peut se fixer sur les récepteurs DR4 (TRAIL-R1) ou DR5 (TRAIL-R2) pour induire l'apoptose, ou sur les récepteurs DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) qui n'induisent pas de signal (récepteur leurre) ou un récepteur soluble appelé OPG (Osteoprotegerin). Plusieurs études montrent que l'IFN-α produit par les pDC en réponse au VIH-1 induit, *in vitro*, l'expression de TRAIL membranaire à la surface des lymphocytes T CD4 et des pDC elles-mêmes (Hardy et al., 2007; Herbeuval et al., 2005b). Les pDC exprimant le TRAIL sont capables d'induire l'apoptose sur une lignée sensible exprimant le DR5 (Hardy et al., 2007). De plus, la fixation du VIH-1 aux lymphocytes T CD4 entraine une augmentation de l'expression du récepteur aux TRAIL DR5 sur ces cellules *in vitro* (Herbeuval et al., 2005a). Néanmoins l'ensemble des études menées *in vivo* rapportent des résultats contradictoires sur les

mécanismes précis mis en jeu dans ce phénomène d'apoptose. Les études s'accordent sur l'expression de la protéine ou de l'ARNm du TRAIL à la surface des pDC circulantes ou sur les cellules présentes dans les tissus lymphoïdes (Herbeuval et al., 2006; Stary et al., 2009). L'expression des transcrits du récepteur DR5 est augmentée dans lymphocytes T CD4 circulants et dans les cellules des amygdales (Herbeuval et al., 2005a ; Herbeuval et al., 2006). Ces travaux montrent que chez les patients sous traitement ou chez les patients non-progresseurs, l'expression du TRAIL et de son récepteur sont diminués probablement parce que la diminution de la virémie entraîne une diminution de l'activation (Herbeuval et al., 2005a ; Stary et al., 2009). De plus, une étude montre que, chez les patients infectés, la diminution de la survie des lymphocytes B mémoires implique l'expression du TRAIL à la surface de ces cellules (van Grevenynghe et al., 2011). La stimulation de l'expression du TRAIL et de ces récepteurs par l'IFN-α et le VIH-1 pourrait faciliter l'apoptose des lymphocytes T CD4 infectés mais aussi des lymphocytes T CD4 non infectés et exposés au VIH-1 ainsi que des lymphocytes B mémoires, contribuant ainsi à la progression de la maladie.

Toutefois, les IFN de type I sont capables d'induire des signaux forts de survie et de prolifération pour les lymphocytes T CD4, et, plus particulièrement, l'apoptose des lymphocytes T CD4 de patients infectés par le VIH-1 a été inhibée par l'IFN-α *in vitro* (Rodriguez et al., 2006). Les lymphocytes T CD4 activés de patients non traités montrent une activité transcriptionnelle bien plus forte pour les gènes stimulés par les IFN et pour les gènes associés au cycle cellulaire comparé aux individus sains (Sedaghat et al., 2007), suggérant que les IFN de type I sont impliqués dans la prolifération des lymphocytes T CD4 de ces patients infectés. Bien que l'infection par le VIH-1 se caractérise par une déplétion massive en lymphocytes T CD4, une étude a montré que la proportion de lymphocytes T CD4 effecteur activé est augmentée au niveau des ganglions lymphatiques des patients (Biancotto et al., 2007). Ainsi, ces travaux suggèrent que l'IFN-α produit par les pDC serait néfaste en stimulant continuellement l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4 en cellules effectrices à courte durée de vie.

L'activation et le dysfonctionnement des lymphocytes T induits par les pDC a aussi été montré via un mécanisme dépendant de l'IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase). Cette enzyme catalyse la dégradation du tryptophane en kynurenine, altérant les capacités de prolifération et d'activation des lymphocytes T. L'IDO est produite par les pDC lorsqu'elles sont incubées avec le VIH-1 et permet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 (Boasso et al., 2008; Boasso et al., 2007; Martinson et al., 2009). De plus les taux plasmatiques d'IDO sont élevés chez les patients infectés par le VIH-1 (Boasso and Shearer, 2008). Plus précisément, la production d'IDO par les pDC activées induit la différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en lymphocytes T

régulateurs qui vont alors inhiber les lymphocytes T effecteurs (Manches et al., 2008), et cette régulation limiterait la réponse immunitaire anti-VIH-1.

En résumé, les pDC et la production d'IFN de type I pourrait être cruciale lors de la transmission et de la phase aigüe de l'infection pour diminuer la réplication du VIH-1, mais à terme l'activation chronique des pDC (IFN de type I, TRAIL, IDO) favoriserait la progression vers la maladie en modulant l'homéostasie de la population lymphocytaire.

# 5 La lignée cellulaire de pDC : les cellules GEN2.2

Les pDC sont des cellules circulantes représentant moins de 0.5 % des PBMC. Bien que les techniques permettant de les purifier soient de plus en plus performantes, le faible nombre de pDC isolées par poche de sang représente une contrainte dans l'étude de leurs fonctions. Les travaux effectués sur les leucémies caractérisées par des cellules $CD4^+$ $CD56^+$ ont permis de montrer que ces cellules dérivent des pDC . En effet, mis à part l'expression du CD56, leurs phénotype est très proche de celui des pDC. Elles sont notamment $CD3^-$, $CD14^-$, $CD19^-$, $CD11c^-$, mais $CD45RA^+$, $CD4^+$, $CD123^+$ (récepteur de l'IL-3), $HLA\text{-}ABC^+$ et $HLA\text{-}DR^+$. Elles n'expriment pas le CD16 (RFcγIII) ni le CD64 (RFcγI). Les marqueurs de co-stimulation CD80 et C86, ainsi que le CD40 peuvent être induit après plusieurs jours de culture avec de l'IL-3 ou du CD40L (Chaperot et al., 2001). L'étude de ces cellules a permis d'obtenir une lignée cellulaire de pDC appelée GEN2.2 (GEN désignant le nom du patient dont les cellules tumorales proviennent), décrite sous le brevet européen EP1572989 et déposée au CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Paris) sous le code I-2938. La prolifération de cette lignée GEN2.2 est dépendante de la présence de fibroblastes murins MS-5 (Murine Stromal 5) préalablement irradiés. En plus de présenter un phénotype identique aux cellules malignes décrites précédemment, cette lignée GEN2.2 exprime BDCA-2, BDCA-4, et les récepteurs au chimiokines CCR5 (expression faible) et CXCR4 (expression forte) (Chaperot et al., 2006). Par ailleurs, la lignée GEN2.2 exprime les récepteurs du TRAIL DR4 et DR5, et est sensible à l'apoptose induite par le TRAIL (Blum et al., 2006). De plus, l'incubation des cellules GEN2.2 avec le virus de l'influenza induit, en 4 heures, l'expression du TRAIL à la surface de ces cellules qui deviennent capable d'induire la mort d'une lignée tumorale épithéliale. L'expression de TRAIL par cette lignée est aussi obtenue avec des agonistes des TLR7 ou TLR9 (Chaperot et al., 2006). L'incubation de cette lignée avec un agoniste du TLR7 ou avec le VIH-1 induit la production d'IDO par les cellules GEN2.2 (Manches et al., 2008). Par contre, les études portant sur la production d'IFN-α par la lignée GEN2.2 suggèrent que ces cellules ne sont pas capables de produire la cytokine antivirale en quantité aussi importante que les pDC primaires. En effet, une étude rapporte qu'avec 300 ng équivalent p24 de VIH-1, les GEN2.2 produisent environ 200

pg/mL d'IFN-α (Manches et al., 2008), alors qu'avec cette même quantité de VIH-1, une étude menée sur les pDC primaires observent une production 35 fois supérieure d'IFN-α (environ 7000 pg/mL) (Beignon et al., 2005). Cependant, dans une autre étude, les cellules GEN2.2 se sont révélées incapables de produire de l'IFN-α en réponse au VIH-1 libre, alors qu'elles ont produit de l'IFN-α lorsqu'elles étaient incubées avec le virus de l'influenza ou incubées avec des cellules préalablement infectées par le VIH-1 (Lepelley et al., 2011).

# Objectifs du travail de thèse

Objectifs du travail de thèse :

Actuellement, le nombre de personnes infectées par le VIH est supérieur à 30 millions. La transmission hétérosexuelle du VIH par les muqueuses est devenue le mode de contamination majeur (environ 80 %). Différentes sous-populations de cellules dendritiques (DC) localisées au niveau des muqueuses sont les cibles du VIH-1, et ces DC peuvent transmettre le virus aux lymphocytes T CD4. Récemment, le recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) a été observé dans les muqueuses vaginales, au site de l'infection. Ces pDC peuvent jouer un rôle prédominant dans la pathogenèse de l'infection, à la fois dans la transmission/dissémination du virus et dans l'activation du système immunitaire.

Un vaccin contre le VIH serait souhaitable, en induisant une réponse immunitaire reposant sur la réponse à médiation cellulaire et la réponse humorale. En particulier, l'induction d'anticorps spécifiques du VIH pourrait permettre de protéger les individus de l'infection. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes par lesquels ces anticorps protègent les cellules de l'infection par le VIH.

Le but de ma thèse a été de caractériser l'activité inhibitrice d'anticorps spécifiques du VIH-1 lorsque les pDC primaires ou la lignée de pDC GEN2.2 sont les cibles d'isolats primaires du VIH-1. A la différence des autres DC, j'ai mis en évidence un mécanisme d'inhibition de l'infection de pDC indépendant du RFcγIIa présent à leur surface. En parallèle, j'ai analysé la production de différentes cytokines et chimiokines par les pDC primaires. Enfin, j'ai étudié le transfert en *cis* et en *trans* du VIH-1 des pDC primaires vers les lymphocytes T CD4 et analysé l'activité inhibitrice d'un anticorps neutralisant sur ce transfert. La production d'IFN-α a été mesurée dans ces conditions.

Les travaux de thèse portant sur l'inhibition de l'infection des pDC par le VIH-1 sont exposés sous forme d'un manuscrit en cours de rédaction (Manuscrit 1). La seconde partie traitant du transfert et son inhibition est présentée sous forme de rapport (Manuscrit 2). Enfin, les chapitres suivants sont constitués des manuscrits publiés, ou en révision auxquels j'ai contribué au sein du laboratoire (Publication 1, Publication 2, Manuscrit 3).

# Résultats

# Manuscrit 1

# L'infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes par le VIH-1 est inhibée par les anticorps neutralisants mais pas par les anticorps non-neutralisants inhibiteurs.

Plasmacytoid dendritic cells infection by HIV-1 is inhibited by neutralizing antibodies but not by non-neutralizing antibodies.

Alexandre Lederle, Vincent Holl, Bin Su, Sylvie Schmidt, Thomas Decoville, Géraldine Laumond and Christiane Moog.

*Publication en cours de rédaction.*

L'inhibition de l'infection des cellules dendritiques (MDDC : cellules dendritiques dérivées de monocytes, LC : cellules de Langerhans, ou iDC : cellules dendritiques interstitielles) ou des macrophages par le VIH-1 avec des anticorps spécifiques du VIH a précédemment été démontré au laboratoire. Nous avons étudié l'activité inhibitrice de ces anticorps sur des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) de lignée (GEN2.2) ou sur des pDC primaire purifiées à partir de sang de donneurs sains.

Nous avons démontré que les anticorps neutralisants spécifiques du VIH inhibent l'infection des pDC, mais que les anticorps non-neutralisants inhibiteurs en sont incapables sur ces cellules. En effet, le RFcγIIa présent à la surface de ces cellules ne participe pas à l'inhibition médiée par les anticorps à la différence des RFcγ présents sur MDDC, LC, iDC ou macrophages. Par ailleurs, lorsque l'infection des pDC primaire est inhibée par les anticorps neutralisants, les pDC restent capables de produire les cytokines et chimiokines IFN-α, MIP-1α, MIP-1β, IL-6, et TNF-α.

Ces résultats suggèrent que les anticorps neutralisants pourraient à la fois permettre de protéger les pDC de l'infection, et, par la production de cytokines, initier une réponse immunitaire forte contre le virus.

*Note : les légendes des figures ont été placées en-dessous de celles-ci.*

# Plasmacytoid dendritic cells infection by HIV-1 is inhibited by neutralizing but not by non-neutralizing inhibitory antibodies.

Alexandre Lederle[1], Vincent Holl[1,2], Su Bin[1], Sylvie Schmidt[1], Thomas Decoville[1], Géraldine Laumond[1] and Christiane Moog[1,*].

[1] UMR_S U748, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

[2] Lab Science Department, Hematology and Flow Department, Covance CLS SA, 7 rue Moise-Marcinhes, CH-1217 Meyrin, Geneva, Switzerland

[*] **Corresponding authors:** Dr Christiane Moog, UMR_S U748, Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France, Tel +33 (0)3 68 85 37 42 ; Fax +33 (0)3 68 85 37 24 ; E-mail: c.moog@unistra.fr

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

**Keywords**: HIV-1, plasmacytoid dendritic cells, neutralizing antibodies, interferon, Fc receptors

**Abbreviations used** : HIV-1, human immunodeficiency virus-1; Ab, antibodies ; APC, antigen presenting cells ; AZT, azidothymidine ; FcγR, IgG Fc receptors ; IFN, interferon ; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells ; pDC, plasmacytoid dendritic cells ; MoDC, monocyte-derived dendritic cells.

**Acknowledgment:** We gratefully acknowledge EuroNeut 41 (FP7-HELTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Dormeur Investment Service Ltd, and ANRS grants. AL was supported by scholarship from ANRS.

**Disclosure of Conflict of Interest:** The authors declare no conflicting financial interests

**Abstract**

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are able to replicate HIV-1, and the decrease of pDC number in blood is correlated with HIV-1 viremia in patients. We evaluated the activity of anti-HIV neutralizing antibodies (NAb) and non-neutralizing inhibitory antibodies (NNIAb) on the infection of primary pDC and GEN2.2 cell line by HIV-1 primary isolates. NAb, but not NNIAb, were able to inhibit HIV-1 replication in both primary pDC and GEN2.2 cells, and this activity was independent of FcγRII expressed on these cells. In parallel, cytokines and chemokines released by primary pDC in presence of HIV-1 and NAb was assessed. We found that the production of IFN-α, MIP-1α, MIP-1β, IL-6, and TNF-α was induced following HIV infection and that this production was maintained in the presence of HIV inhibitory Ab. In the context of antibodies induction by vaccination, the inhibition of HIV-1 replication associated with the maintenance of pro-inflammatory cytokines released by primary pDC may help to eliminate the virus and impede the early HIV dissemination.

## Introduction

Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 is responsible of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) epidemics. Antiretroviral therapy is available to treat infected people but there is still a strong need for a sterilizing vaccine. One vaccination strategy relies on inducing antibodies that would inhibit the infection of HIV-1 target cells at the very beginning of the virus transmission.

Today, several antibodies have been characterized for their ability to efficiently inhibit CD4 T lymphocytes infection by a broad range of HIV-1 primary isolates *in vitro*, as b12, 2G12, 447-52D, 2F5, 4E10, and more recently PG9, PG16, and VRC01. These antibodies inhibit HIV infection *in vitro* in conventional neutralization assay on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or on TZM-bl cells [1,2,3]. Numerous in vivo studies however suggest that additional mechanisms to neutralization may help to protect from HIV acquisition. A study showed that Fcγ portion of NAb participate in macaques protection from a SHIV vaginal challenge, as the passive transfer of IgG1 b12 mutant LALA (unable to bind FcγR) was significantly less efficient in protecting animals from mucosal infection then the wild-type IgG1 b12 [4]. Recently, the same group showed that Fc-mediated protection is not increased by enhancing Fc-mediated ADCC activity, suggesting that additional Fc-mediated function of antibodies may participate in protection [5]. Our group reported an additional mechanism dependent of the FcγR expressed on APC [6,7,8,9]. Among HIV-1 target cells, monocyte-derived dendritic cells (MoDC), Langerhans cells, interstitial DC and macrophages were efficiently protected from HIV-1 infection by NAb. Furthermore, additional anti-HIV antibodies, which did not exhibit classical neutralizing activity, inhibited the HIV-1 infection of these APC by the FcγR-dependent mechanism only [7,9]. Such antibodies are referred to as non-neutralizing inhibitory antibodies (NNIAb).

pDC are infected by HIV-1 [10,11] and some studies showed an inverse correlation between the level of blood pDC number and HIV-1 viremia [12,13]. Compared to mDC, human plasmacytoid dendritic cells (pDC) only express FcγRIIa and not the other FcγR [14]. They are well known to produce chemokines and cytokines, in particular large amounts of type I interferon (IFN) in response to viral nucleic acids [15,16] or in the presence of HIV [17].

In this study, we assessed the capacity of antibodies (NAb and NNIAb) to inhibit HIV-1 replication in pDC, and analyzed the participation of FcγRIIa in this inhibition. As the number of pDC purified from a blood donor is limited (pDC represent less than 0.5 % of PBMC), anti-HIV antibodies inhibitory activity was assessed on the pDC cell line GEN2.2 [18]. In addition, the production of IFN-α, MIP-1α, MIP-1β, IL-6, and TNF-α by pDC was analyzed following protection from HIV-1 infection by Ab.

.

## Materials and methods

### Cell culture.

Cells were cultured at 37 °C, 5% $CO_2$, in RPMI 1640 + GlutaMAX™ (GIBCO), medium supplemented 100 IU of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin (GIBCO).

### Primary pDC preparation.

Briefly, primary pDC were isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy HIV-1-seronegative blood donors (EFS, Strasbourg, France) by magnetic purification using an AutoMacs (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). Magnetic purification of pDC was performed using BDCA-4 MicroBeads kit, BDCA-2 MicroBeads kit or Plasmacytoid Dendritic Cell isolation kit (Miltenyi Biotec). Primary pDC were cultured overnight at $10^6$ cells/mL in medium supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) and 1 ng/mL of interleukin-3 (IL-3) (R&D Systems, Minneapolis, USA) before being used.

### MoDC preparation.

Similarly to primary pDC, monocytes were purified from PBMC by magnetic purification using CD14 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec). Purified monocytes were differentiated in MoDC at $2.10^6$ cells/mL in medium supplemented with 5 % FCS, 10 ng/mL of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF ; R&D systems) plus 20 ng/mL IL-4 (R&D Systems), as previously described [7,8,19].

### GEN2.2 cell line culture.

GEN2.2 cell line is derived from a leukemic tumor and keep a phenotype very close to primary pDC. GEN2.2 cells were cultured at $10^5$ cells/mL in medium on a layer of irradiated (60 Gy) murine MS5 fibroblasts as feeder. Prior to experiments, GEN2.2 cells were harvested from this co-culture and cultured alone at $10^6$ cells/mL overnight.

### Virus preparation.

For each primary isolate, amplification was performed on PBMC from seronegative donors to obtain virus stocks, as previously described [8]. Virus stocks were collected at the peak of virus production and were concentrated 70-fold using a 100-kDa cutoff polyethersulfone filter (Centricon 70 Plus Biomax filter; Millipore, Molsheim, France). HIV-$1_{BaL}$ (subtype B, R5 strain) primary isolate was provided by S. Gartner, M. Popovic, and R. Gallo from the National Institutes of Health (NIH). HIV-$1_{TV1}$ (subtype C, R5 strain) primary isolate was obtained from S. Engelbrecht.

**HIV-1-specific antibodies.**

Anti-HIV-1 human mAbs to gp-120 IgG1 b12 and LALA was kindly provided by D. Burton. Human mAb 447-52D (anti-gp120), and 246-D (anti-gp41) were provided by S. Zolla-Pazner (NYU, New York, USA). Human mAbs 4E10, 2F5, 4B3, 3D6 (anti-gp41), and 2G12 (anti-gp120) was provided by D. Katinger (Polymun Scientific GmbH, Vienna, Austria). Human mAb VRC01(anti-gp120) was provided by J. R. Mascola.

**HIV-1 inhibitory assays.**

25µL of HIV primary isolate was incubated with 25µL of antibodies during 1 hour before the addition of 25µL of either primary pDC ($10.10^6$ cells/mL) or GEN2.2 cells ($4.10^6$ cells/mL) or MoDC ($15.10^6$ cells/mL) respectively. HIV primary isolate was used at 1.25 µg/mL, 0.25 µg/mL or 2 µg/mL of p24 antigen with primary pDC, GEN2.2 cells or MoDC respectively, in order to obtain about 3 % of infected cells. When indicated, HIV reverse transcriptase inhibitor Azidothymidine (AZT, Sigma) was added at 5 µM in the cell culture to inhibit the virus replication, allowing to measure the residual p24 detected in the absence of *de novo* virus synthesis. After 48 hours, staining of different cell surface markers and intracellular HIV p24 protein was performed to characterize the cells (primary pDC and GEN2.2 as $CD123^+$ events, and MoDC as $CD209^+$ events) and to determine the percentage of infected cells by

flow cytometry analysis. The concentration of antibodies required to inhibit 90% of the cells infection (IC90) was determined.

To analyze the role of FcγR in HIV-1 inhibition, primary pDC were incubated with 10 µg/mL of anti-FcγRII pure antibody (3D3, BD Pharmingen) 30 minutes prior to addition to the HIV-1/Ab immune complexes.

**Immunophenotyping and flow cytometry analysis.**

Briefly, cells were labeled with Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain kit (Invitrogen Life Science, Applied Biosystems Inc. California, USA) for 10 minutes at room temperature. Mouse monoclonal fluorescent antibodies against human CD123-Pe-Cy5 (9F5, BD Pharmingen, San Jose, USA), anti-human CD32-FITC (3D3, BD Pharmingen), anti-human DC-SIGN-PerCP-Cy5.5 (DCN46, BD Pharmingen) and anti-human CD83-APC (HB15, Miltenyi Biotec) were added during 10 minutes at 4°C. Cells were fixed and permeabilized using the Cytofix and Perm/Wash solutions (BD Biosciences). Then intracellular p24 antigen was stained using anti-HIV Core protein p24 RD-1 or FITC (KC57, Beckman Coulter, Roissy, France). Multi-color samples were acquired on a LSRII SORP cytometer (BD Biosciences) calibrated using Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) to ensure consistency of fluorescence intensity measurement throughout all experiments. Compensation was performed with CompBeads kit (BD Biosciences). Doublet cells were excluded using Forward Scatter Width and Forward Scatter Area and dead cells were excluded using Live/Dead staining. The final analysis and graphical output were performed using FACSDiva™ software version 6.1.2 (BD Biosciences).

**Cytokine Analysis.**

Supernatants were collected at different time points during inhibitory assays for cytokines production analysis. IFN-α production was measured using Verikine Human Interferon Alpha MultiSubtype ELISA kit (PBL InterferonSource, New Jersey, USA). MIP-1α, MIP-1β, IL-6

and TNF-α production were measured by Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences) using appropriate Flex sets and Human Soluble Protein Master Buffer kit (BD Biosciences), acquired on a LSRII SORP cytometer (BD Biosciences), and analyzed using FCAP Array software version 1.0.1 (Soft Flow, Hungary).

**Antibody binding assay.**

Primary pDC were incubated with or without 10 µg/mL of anti-FcγRII (CD32) pure antibody (3D3, BD) during 30 minutes, then cells were labeled with anti-CD32 FITC (3D3, BD) during 10 minutes at 4 °C. After fixation with Cytofix solution, samples were acquired on a LSRII SORP cytometer (BD Biosciences) calibrated using Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) and analyzed using FACSDiva™ software version 6.1.2.

GEN2.2 cells were incubated with 20 µg/mL of different anti-HIV-1 specific antibody for 30 minutes at room temperature, washed four times with PBS containing 5 % FCS, and incubated with goat $F(ab')_2$ fragment anti-human IgG (Fcγ)-PE (Beckman Coulter) during 30 minutes at room temperature. After three washes, cells were fixed with Cytofix solution. Samples were acquired on MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec) calibrated with MACSQuant Calibration Beads (Miltenyi Biotec) and analyzed using MACSQuantify software version 2.4 (Miltenyi Biotec).

**Statistical analysis.**

Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test). Values of $p<0.05$ were considered to be statistically significant. All statistical calculations were performed using GraphPad Prism 5.04 software (GraphPad, San Diego, California, USA).

## Results

### GEN2.2 pDC cell line as a model to study anti-HIV-1 antibody inhibitory activity.

First, we measured the level of expression of FcγRII on GEN2.2 cell line and on primary pDC after different isolation protocol (BDCA-2 positive selection, BDCA-4 positive selection or depletion). We observed that 65.5 % of GEN2.2 cells were FcγRII$^+$ (figure 1A). We were able to detect FcγRII$^+$ on primary pDC after each protocol of purification (data not shown), but we observed a higher intensity signal after BDCA-4 positive selection with 41.2 % of FcγRII$^+$ primary pDC (figure 1A). Thus primary pDC isolated by BDCA-4 positive selection were selected for further inhibitory experiments.

Infection of GEN2.2 pDC cell line by HIV-1 was measured by flow cytometry using the size and the structure (figure 1B, left dot plot), selecting the living population (figure 1B, right dot plot), then measuring the percentage of p24$^+$ cells among the CD123$^+$ population (figure 1C, top left dot plot, mock condition). After 48h of infection with HIV-$1_{BaL}$, we could detect 3.0 % of GEN2.2 pDC positive for p24, compared to the 0.1 % of AZT control (figure 1C, left, middle and bottom dot plots, respectively), and 3.5 % and 0.1 % of p24$^+$ primary pDC in the presence of HIV-$1_{BaL}$ and AZT respectively (figure 1C, right, middle and bottom dot plots, respectively). Our experimental conditions allowed the detection of similar percentage of infected GEN2.2 cells and primary pDC by flow cytometry analysis of p24 staining. We were also able to detect a similar percentage of the infection of MoDC, as previously described [8]. Thus we were able to further study the inhibitory activity of anti-HIV-1 specific antibodies on the infection of these cells and the role of FcγRII in this inhibition.

### Similar neutralizing antibodies inhibition of HIV-1 infection on GEN2.2 cells and primary pDC.

The inhibitory activity of a panel of anti-HIV-1 antibodies was analyzed on GEN2.2 cell line and primary pDC infection by HIV-1. Different concentrations of antibodies were used and

after 48 hours, the percentage of infection was analyzed by flow cytometry with the same gating strategy as previously described (figure 1B and 1C). First, the viability of primary pDC was similar for all the experimental conditions: approximately 70 % of primary pDC were still alive after 48 hours incubation with or without HIV-1 and with or without anti-HIV-1 antibodies (figure S1A). Primary pDC expression of CD83 (maturation marker) was not statistically different between the various experimental conditions (figure S1B). These results showed that during neutralization assay, neither HIV-1 nor antibodies influenced the viability or the maturation of the primary pDC.

Infection of GEN2.2 cells by HIV-$1_{BaL}$ was successfully inhibited by all the six NAb with a stronger activity for anti-gp120 antibodies VRC01, 2G12 and b12 compared to anti-gp120 antibody 447-52D and anti-gp41 antibodies 4E10 and 2F5 (figure 2A). On the other hand, when GEN2.2 cells were infected with HIV-$1_{TV1}$, only NAb 2G12, 2F5 and 4E10 were able to inhibit their infection, unlike NAb VRC01, b12 and 447-52D (figure 2B). Inhibitory activity of NAb was next analyzed on primary pDC infected with HIV-$1_{BaL}$. The concentration of antibody required to inhibit 90% of the infection ($IC_{90}$), represented in table 1, indicated that all six NAb were able to inhibit HIV-$1_{BaL}$ infection of primary pDC: anti-gp120 antibody VRC01 exhibited the strongest activity with an $IC_{90}$ of 7 µg/mL, and anti-gp41 antibody 4E10 was the weakest with an $IC_{90}$ of 100 µg/mL (table 1). $IC_{90}$ observed on GEN2.2 cells and primary pDC were of the same order of magnitude (figure 2 and table 1) demonstrating that the GEN2.2 cell line constitutes a good model for the study of the inhibitory activity of anti-HIV Ab on pDC. Interestingly, these $IC_{90}$ were about 10-fold higher than $IC_{90}$ measured when MoDC were HIV-1 target cells. Exception was observed for anti-gp120 NAb 2G12 and b12 on HIV-$1_{BaL}$, and for anti-gp41 NAb 2F5 on HIV-$1_{TV1}$ where similar $IC_{90}$ was observed for GEN2.2 cells and MoDC.

Then, we analyzed the inhibitory activity of NNIAb that were previously described to inhibit HIV-1 replication only in FcγR-bearing cells (MoDC, Langerhans cells, iDC, macrophages) [7,9]. NNIAb 246-D and 4B3, both binding to the principal immunodominant domain (PID) of the gp41, were unable to inhibit the infection of the GEN2.2 cells by HIV-$1_{BaL}$ or HIV-$1_{TV1}$ (dotted line, figure 2A and 2B respectively, and table 1), or the infection of primary pDC by HIV-$1_{BaL}$ although these NNIAb efficiently inhibited HIV-1 replication in MoDC (table 1). The anti-gp41 Ab 3D6, although recognizing similar conserved sequence of the PID, did not display any inhibitory activity on HIV-1 replication in the different cell populations. This antibody was, thus, used as a control and called non-neutralizing non-inhibitory antibody (NNNIAb). Altogether, these results showed that infection of GEN2.2 cells and primary pDC by HIV-1 is inhibited by neutralizing antibodies, but not by non-neutralizing inhibitory antibodies suggesting an FcγR-independent mechanism of HIV-1 inhibition by antibodies on pDC.

**FcγRII does not participate in HIV-1 inhibition by antibody on pDC**

The decreased activity of NAb observed on pDC compared to MoDC and the lack of efficacy of NNIAb to inhibit GEN2.2 cells and primary pDC infection raise the question of FcγRIIa involvement in the inhibition of pDC infection by HIV-1. To address this question, we analyzed the neutralizing activity of NAb b12 and a mutant version of b12 called LALA on both GEN2.2 cells and primary pDC. This mutant Ab LALA is almost unable to bind to FcγRs [4]. Inhibition of HIV-1 replication by LALA and b12 was similar when either GEN2.2 cell line or primary pDC were used as target cells of HIV-$1_{BaL}$ (figure 3A left and right respectively), indicating that HIV-1 inhibition was independent of Fcγ-FcγR interaction on these cells. Next, the binding capacity of anti-HIV-1 specific antibodies on FcγRII expressed by GEN2.2 cells was assessed by flow cytometry. We found that NAb VRC01, NNIAb 4B3 and NNNIAb 3D6 were able to bind to GEN2.2 cells (about 23 % of the cells showed positive

staining), whereas Ab LALA bound poorly to these cells (1.3 % of the cells) (figure S2). Thus, anti-HIV-1 specific Ab were able to bind FcγRII via the Fc part of the Ab on GEN2.2 cells, but this binding did not lead to the inhibition of HIV-1 infection of these cells. Furthermore, competitions experiments were performed with anti-FcγRII antibody on primary pDC. The capacity of 10 µg/mL of anti-FcγRII to fully block further Ab binding was controlled and no fluorescent signal could be measured after the labeling of the cells with a fluorescent anti-FcγRII antibody (figure 3B). When primary pDC were incubated with 10 µg/mL of anti-FcγRII prior to incubation with HIV-$1_{BaL}$ and NAb VRC01, the percentage of infection in the primary pDC was not different from the percentage of infection in the untreated pDC control (figure 3C). Altogether, these data showed that FcγRIIa, at the surface of pDC, does not participate in the HIV-1 inhibition by NAb.

**Cytokines production by primary pDC is partially maintained when HIV-1 replication is inhibited by NAbs.**

The production of IFN-α by pDC was measured in the supernatants when pDC were protected from HIV-1 infection by NAb. IFN-α production could not be detected in the supernatants of GEN2.2 cells, whatever conditions used (data not shown). However, IFN-α production was detected in the supernatants of primary pDC following HIV-1 infection (HIV), whereas low level or no production of IFN-α was measured in the absence of HIV (Mock) (figure 4 all charts), or in the presence of NAb alone (data not shown). While IFN-α production was strongly inhibited in the presence of anti-gp120 NAb b12 at concentration over 10 µg/mL, this production was restored at lower concentration of b12 (figure 4, top charts). The mutant version of b12 antibody, LALA, showed identical inhibition on IFN-α production (figure 4, top charts), indicating that FcγRII was not involved in this reduction of IFN-α production. Interestingly, anti-gp120 NAb VRC01 that was more potent than b12 to inhibit HIV-1 replication in primary pDC did not inhibit the IFN-α production by these cells (figure 4,

bottom charts). Similarly, anti-gp41 NAb 4E10 was able to inhibit HIV-1 replication in primary pDC while the IFN-α production was similar to the HIV-1 replication control (figure 4, middle charts). Kinetics experiment showed a similar profile of IFN-α induction indicating that the presence of NAbs did not delay the initiation of the IFN-α secretion (figure S3). These data showed that infection of primary pDC by HIV-1 is independent of IFN-α production, and that reduction of IFN-α production occurs for some NAb in an Fc-independent mechanism.

Additional cytokines and chemokines (MIP-1α, MIP-1β, IL-6, and TNF-α), known to be produced by primary pDC, were measured in the supernatants of infected pDC in the presence or absence of NAb (figure 5). First, when HIV-1 replication was inhibited by NAb VRC01, b12 or 4E10, we found no difference in the production of IL-6 by primary pDC (figure 5, third column charts). Concentrations of NAb b12 and VRC01, that were able to inhibit HIV-1 replication in primary pDC, did not modulate the production of MIP-1α, MIP-1β, or TNF-α (figure 5, middle line charts and bottom line charts respectively). Noteworthy, in the presence of NAb 4E10, the production of MIP-1α, MIP-1β, and TNF-α was increased in the supernatants (figure 5, top line charts). When 4E10 was incubated alone at 100 µg/mL with primary pDC, no induction of the production of these three molecules was observed (data not shown), showing that increased production of MIP-1α, MIP-1β, and TNF-α by primary pDC requested both NAb 4E10 and HIV-1. Similarly to IFN-α, we found a similar profile of cytokines/chemokines production in kinetics experiment (figure S4). Altogether, these data showed that primary pDC maintained their ability to produce pro-inflammatory cytokines MIP-1α, MIP-1β, IL-6, and TNF-α when HIV-1 replication was inhibited by NAb.

**Discussion**

Here, we analyzed the Ab inhibition on HIV-1 infection of pDC. These APC have the particularity to express only FcγRIIa and no other FcγRs [14], therefore allowing us to investigate the role of this receptor in the inhibition of HIV-1 replication. The GEN2.2 cell line was used in parallel to primary pDC to confirm the inhibitory activity of anti-HIV-1 specific Ab on pDC infection. The concentration of HIV-1 used to infect primary GEN2.2 cells was 5-fold lower compared to the concentration used to infect primary pDC, but the inhibitory activity of NAb were very similar to the $IC_{90}$ measured on primary pDC.

Interestingly, inhibitory activities of NAb on pDC infection were lower than the inhibitory activities detected on MoDC. Likewise, $IC_{90}$ of NAb showed a stronger potency of the antibodies to inhibit the MoDC infection when compared to the $IC_{90}$ measured on PBMC, and this difference was dependent on Fcγ-FcγR interaction [7,8]. In addition, we could not detect an anti-HIV-1 activity of anti-PID Ab 246-D and 4B3 when GEN2.2 cell line or primary pDC were HIV-1 target cells whereas these anti-PID Ab exhibited an Fc-mediated inhibitory activity on MoDC [7]. These so-called Non-Neutralizing Inhibitory Antibodies (NNIAb) were unable to protect PBMC from infection (Non-Neutralizing) but were able to inhibit the infection of MoDC (Inhibitory) via the participation of FcγRII expressed at the surface of the cells [7]. It has been published that MoDC express both FcγRIIa and FcγRIIb [20] whereas 30 to 50% of blood pDC only express FcγRIIa [14] therefore suggesting that FcγRIIa did not participate in Fc-mediated inhibitory activity in pDC. In a previous study, induction of the expression of the different FcγR in TZM-bl cell line (used for standardized assessment of HIV-1 neutralization) has shown that FcγRIIb participate in HIV-1 inhibition by anti-gp41 Ab whereas FcγRIIa had little to no effect [21]. Accordingly with these results, we failed to observe an Fc-mediated inhibition of HIV-1 replication in pDC expressing only FcγRIIa.

As pDC were shown to actively participate in early innate production of cytokines and chemokines, we analyzed the production of IFN-α, IL-6, MIP-1α/β and TNF-α in presence of anti-HIV-1 specific Ab. We found that pDC produce IFN-α, IL-6, MIP-1α/β and TNF-α in the presence of HIV-1, even when the productive infection was inhibited by NAb. A previous study showed that anti-gp120 NAb b12 was able to fully block IFN-α production by pDC in response to HIV-$1_{MN}$, and that NAb 17b could also partially block this production [17]. Here, we were still able to measure a production of IFN-α in response to HIV-$1_{BaL}$ with NAb b12, although this production decreased with higher concentration of the antibody (over 10 µg/mL). In addition, the anti-gp120 NAb VRC01 had no effect on IFN-α production of primary pDC in response to HIV-$1_{BaL}$, indicating that IFN-α production was not dependent on the gp120-CD4 interaction in this condition. The differences with previous study may be explained by the variations in experimental conditions. We used the HIV-$1_{BaL}$ strain at high concentration and obtained pDC productive infection whereas HIV-1 replication in pDC was not assessed in the previous study. Primary pDC were cultured at high concentration possibly enhancing their IFN-α production, as previously suggested [22]. Interestingly, Beignon *et al*. showed the maturation (expression of CD83) of the pDC incubated with HIV-$1_{MN}$, whereas we did not observed any difference in the level of CD83 expression following HIV-$1_{BaL}$ infection of primary pDC. The difference in the maturation state of primary pDC may also explain the difference in IFN-α production. In parallel to IFN-α production, we observed an increased production of chemokines MIP-1α/β in the supernatant of pDC incubated with HIV-1. Interestingly the chemokines production was increased in the presence of NAb 4E10. Previously, an increased production of MIP-1α/β has been observed in a study where anti-cardiolipins antibodies were added to PBMC [23]. Moreover a study showed that NAb 4E10 was polyspecific and was able to bind to both cardiolipins and HIV gp41 protein [24]. Although we did not measured a production of any cytokines or chemokines when pDC were

cultivated alone with NAb 4E10, this antibody could have stimulated and increased the production of MIP-1α/β or TNF-α by primary pDC in response to HIV-1.

In conclusion, we showed that infection of pDC by HIV-1 is inhibited by NAb in an FcγRIIa-independent mechanism, and that pDC protected from HIV-1 continue to produce cytokines in response to HIV-1.

Different studies have suggested the detrimental role of IFN-α production by pDC in disease progression. In asymptomatic untreated HIV-infected patients, pDC produced higher amounts of IFN-α compared to uninfected individuals [25]. Moreover, IFN-α production by pDC is maintained during the chronic phase in the pathogenic model of SIV infection (rhesus macaque), whereas this production was downregulated during the transition from acute to chronic phase in the nonpathogenic model of SIV infection (African green monkeys and sooty mangabeys) [26]. These studies suggest that IFN-α production by pDC in the chronic phase may contribute to the disease progression. We showed that anti-HIV-1 Ab were not able to decrease the IFN-α production induced by HIV-1. These results are in accordance with the sustained IFN-α production and the persistence of HIV-1 and anti-HIV-1 Ab in asymptomatic individuals. However, in the context of a vaccine development, induction of anti-HIV-1 neutralizing antibodies that simultaneously protect HIV-1 target cells and allow innate immune cells to maintain an immune response with IFN-α production would be highly beneficial.

## References


1. Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, et al. (2004) Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. Journal of Virology 78: 13232-13252.

2. Polonis VR, Brown BK, Borges AR, Zolla-Pazner S, Dimitrov DS, et al. (2008) Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. Virology 375: 315-320.

3. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, et al. (2009) Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target. Science 326: 285-289.

4. Hessell AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CEG, Beurskens FJ, et al. (2007) Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature 449: 101-104.

5. Moldt B, Shibata-Koyama M, Rakasz EG, Schultz N, Kanda Y, et al. (2012) A Nonfucosylated Variant of the anti-HIV-1 Monoclonal Antibody b12 Has Enhanced Fc RIIIa-Mediated Antiviral Activity In Vitro but Does Not Improve Protection against Mucosal SHIV Challenge in Macaques. Journal of Virology 86: 6189-6196.

6. Holl V, Hemmerter S, Burrer R, Schmidt S, Bohbot A, et al. (2004) Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. J Immunol 173: 6274-6283.

7. Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, et al. (2006) Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. J Virol 80: 6177-6181.

8. Holl V, Peressin M, Schmidt S, Decoville T, Zolla-Pazner S, et al. (2006) Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. Blood 107: 4466-4474.

9. Peressin M, Holl V, Schmidt S, Decoville T, Mirisky D, et al. (2011) HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies. J Virol 85: 1077-1085.

10. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F (2001) Plasmacytoid Dendritic Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Release Infectious Virus. Journal of Virology 75: 6710-6713.

11. Smed-Sorensen A, Lore K, Vasudevan J, Louder MK, Andersson J, et al. (2005) Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. Journal of Virology 79: 8861-8869.

12. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, et al. (2001) Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. Blood 98: 906-912.

13. Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, et al. (2001) Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. Blood 98: 2574-2576.

14. Bave U, Magnusson M, Eloranta ML, Perers A, Alm GV, et al. (2003) Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. J Immunol 171: 3296-3302.

15. Liu Y-J (2005) IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. Annual Review of Immunology 23: 275-306.

16. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nature Reviews Immunology 8: 594-606.

17. Beignon AS (2005) Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. Journal of Clinical Investigation 115: 3265-3275.

18. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, et al. (2006) Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. J Immunol 176: 248-255.

19. Holl V, Xu K, Peressin M, Lederle A, Biedma ME, et al. (2010) Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. J Virol 84: 4172-4182.

20. Boruchov AM (2005) Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. Journal of Clinical Investigation 115: 2914-2923.

21. Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF, Montefiori DC (2009) Utilization of Immunoglobulin G Fc Receptors by Human Immunodeficiency Virus Type 1: a Specific Role for Antibodies against the Membrane-Proximal External Region of gp41. Journal of Virology 83: 7397-7410.

22. Liao AP, Salajegheh M, Morehouse C, Nazareno R, Jubin RG, et al. (2010) Human plasmacytoid dendritic cell accumulation amplifies their type 1 interferon production. Clinical Immunology 136: 130-138.

23. Moody MA, Liao HX, Alam SM, Scearce RM, Plonk MK, et al. (2010) Anti-phospholipid human monoclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce -chemokines. Journal of Experimental Medicine 207: 763-776.

24. Alam SM, McAdams M, Boren D, Rak M, Scearce RM, et al. (2007) The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. J Immunol 178: 4424-4435.

25. Lehmann C, Lafferty M, Garzino-Demo A, Jung N, Hartmann P, et al. (2010) Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients. PLoS ONE 5: e11110.

26. Harris LD, Tabb B, Sodora DL, Paiardini M, Klatt NR, et al. (2010) Downregulation of Robust Acute Type I Interferon Responses Distinguishes Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection of Natural Hosts from Pathogenic SIV Infection of Rhesus Macaques. Journal of Virology 84: 7886-7891.

**Table 1. Inhibitory activity of neutralizing Ab (NAb) and non-neutralizing inhibitory Ab (NNIAb) when GEN2.2 cells, primary pDC or MoDC were used as target cells of HIV-$1_{BaL}$ or HIV-$1_{TV1}$.** $IC_{90}$: concentration (µg/mL) of antibody necessary to inhibit 90% of the number of infected cells ; -, no inhibitory activity detected over 100 µg/mL of Ab; nd, not done. NNNIAb, non neutralizing non inhibitory anti-HIV antibody. * Data published by Holl *et al*. (J Virol, 2006).

| | $IC_{90}$(µg/mL) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HIV-$1_{BaL}$ | | | HIV-$1_{TV1}$ | |
| **monoclonal IgG** | **GEN2.2** | **pDC** | **MoDC** | **GEN2.2** | **MoDC** |
| NAb | | | | | |
| 2F5 | 20 | 70 | 1* | 5 | 6* |
| 4E10 | 60 | 100 | 5* | 20 | 2* |
| $IgG_1$ b12 | 2 | 8 | 1* | - | -* |
| 2G12 | 1 | 10 | 1* | 20 | 5* |
| 447-52D | 30 | 80 | 2* | - | -* |
| VRC01 | 0,5 | 7 | nd | - | nd |
| NNIAb | | | | | |
| 246-D | - | - | 45* | - | nd |
| 4B3 | - | - | 45 | - | nd |
| NNNIAb | | | | | |
| 3D6 | - | - | - | - | - |

## Figures

### Figure 1

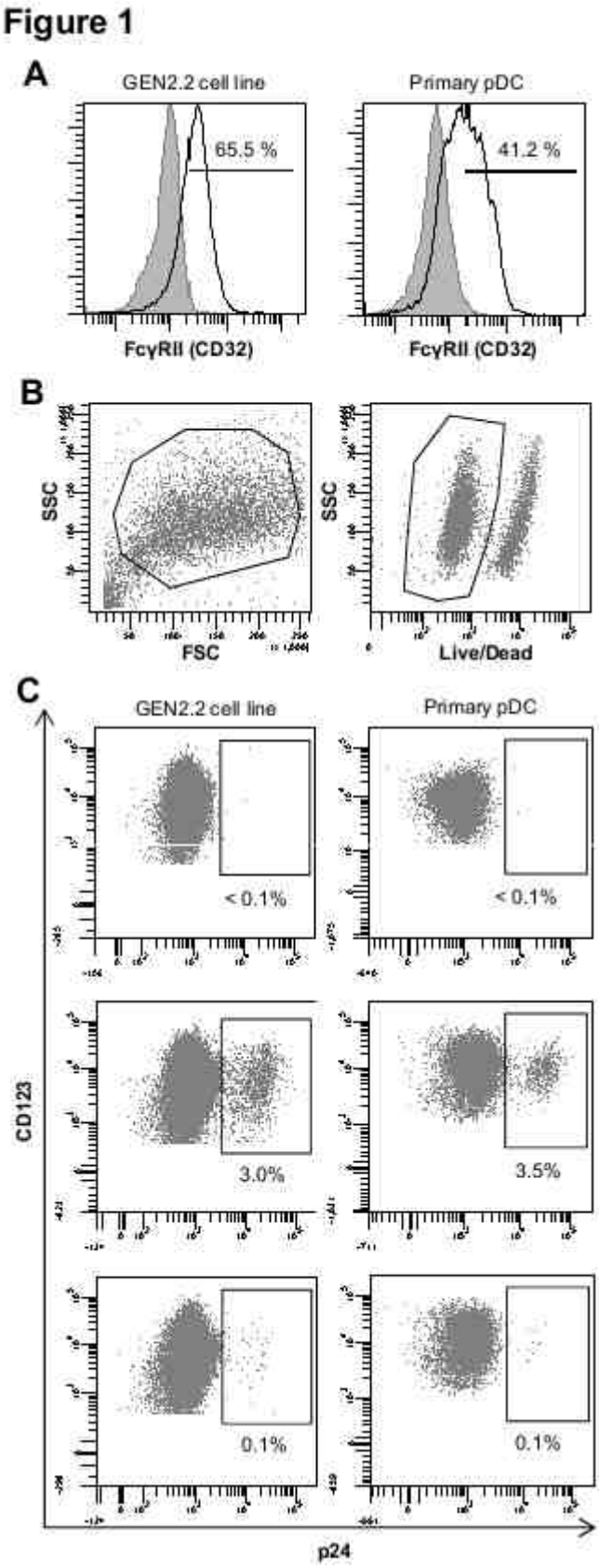


**Figure 1. GEN2.2 cell line and primary pDC express FcγRII and are productively infected by HIV-1.** A, The percentage of FcγRII-positive cells was determined for GEN2.2 cell line (A, left) and for primary pDC (A, right), isotype control is in grey and FcγRII staining is the black line. B, Dot plots representation of GEN2.2 cells analysis by flow cytometry. Events were sorted using forward and side scatter (B, left), doublets events were excluded and analysis was performed on alive cells using Live/Dead exclusion (B, right). C, Productive infection was detected by intracellular immunolabeling of the p24 HIV antigen in CD123-positive GEN2.2 cells (left) or CD123-positive primary pDC (right). Dot plots show non-infected control (top), HIV-$1_{BaL}$ replication (middle), and negative control of HIV-$1_{BaL}$ replication with reverse transcriptase inhibitor AZT (5 μM) (bottom).

**Figure 2**

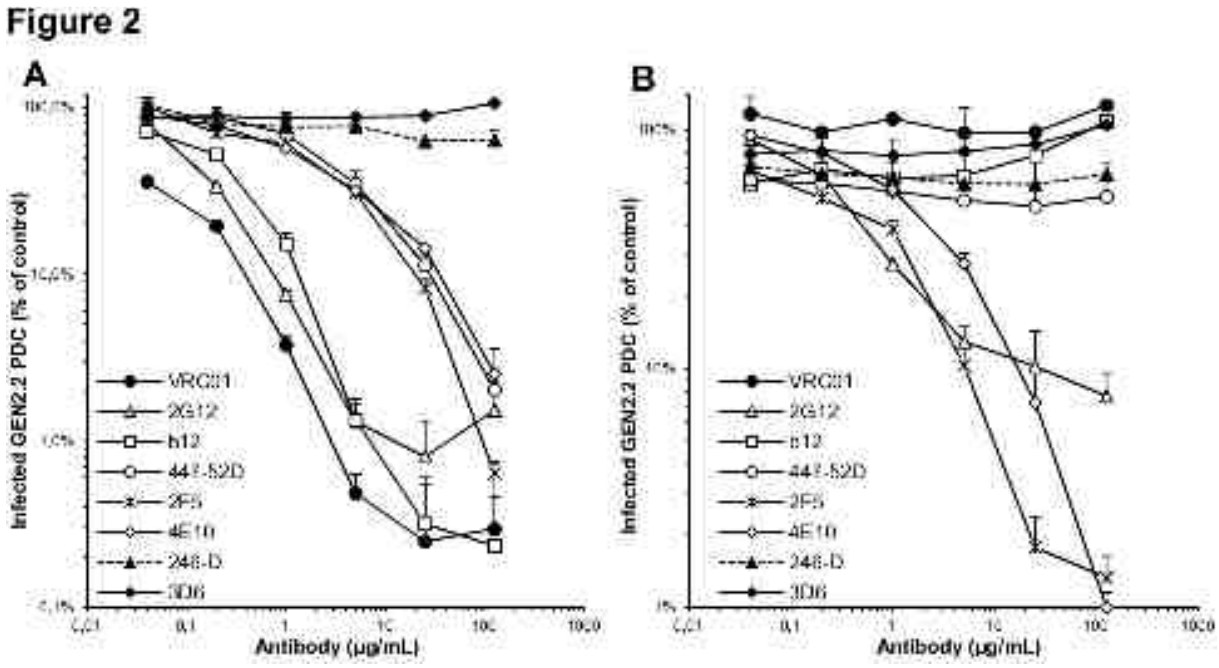



**Figure 2. Antibody-mediated inhibition of GEN2.2 cell line infection by HIV-1.** The percentage of infection of GEN2.2 cells in the presence of different concentrations of antibody (µg/mL) compared to control without antibody is represented. GEN2.2 cells were incubated with HIV-$1_{BaL}$ (A) or HIV-$1_{TV1}$ (B). Data are representative of three independent experiments and are expressed as means + standard deviation (SD) of infected cells compared to the control.

**Figure 3**

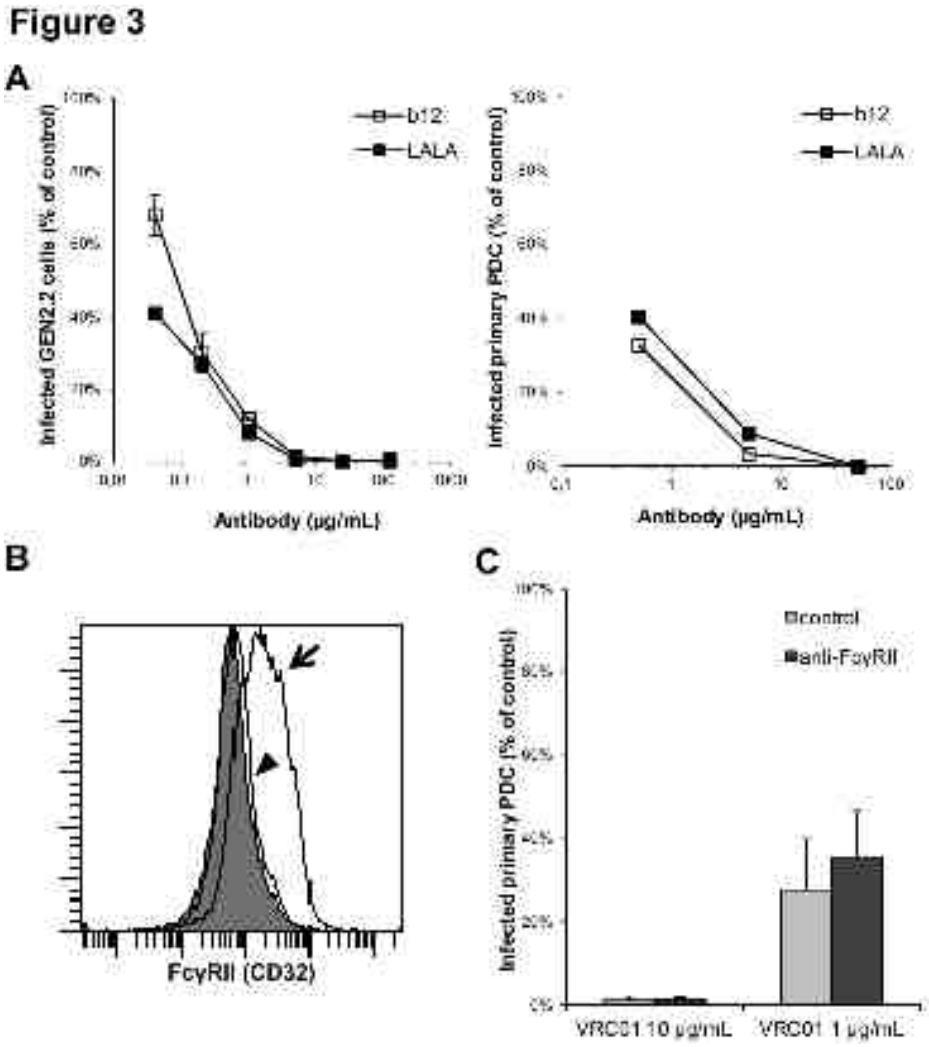



**Figure 3. Role of FcγRII in the inhibition of primary pDC or GEN2.2 cells infection by HIV-$1_{BaL}$.** Data represent the percentage of infected cells by HIV-$1_{BaL}$ in the presence of different concentration of antibody b12 or LALA (µg/mL) compared to the control condition without antibody, when GEN2.2 PDC cell line (A, left) or primary pDC (A, right) were the target cells. Data are representative of three independent experiments on GEN2.2 cells and of three independent experiments performed with three different healthy donors on primary pDC. B, Detection of FcγRII on primary pDC after 30 minutes incubation with anti-FcγRII antibody (10 µg/mL) (black line, arrowhead), or in control condition (black line, arrow) ; isotype control in grey. C, Primary pDC were incubated with or without anti-FcγRII antibody (10 µg/mL) during 30 minutes and were then added to HIV-$1_{BaL}$ pre-incubated in the presence

or absence of different concentration of NAb VRC01 ; percentage of infected cells was determined by the intracellular staining of viral antigen p24. Data are the means ± SD of two independent experiments performed with two different healthy donors.

**Figure 4**

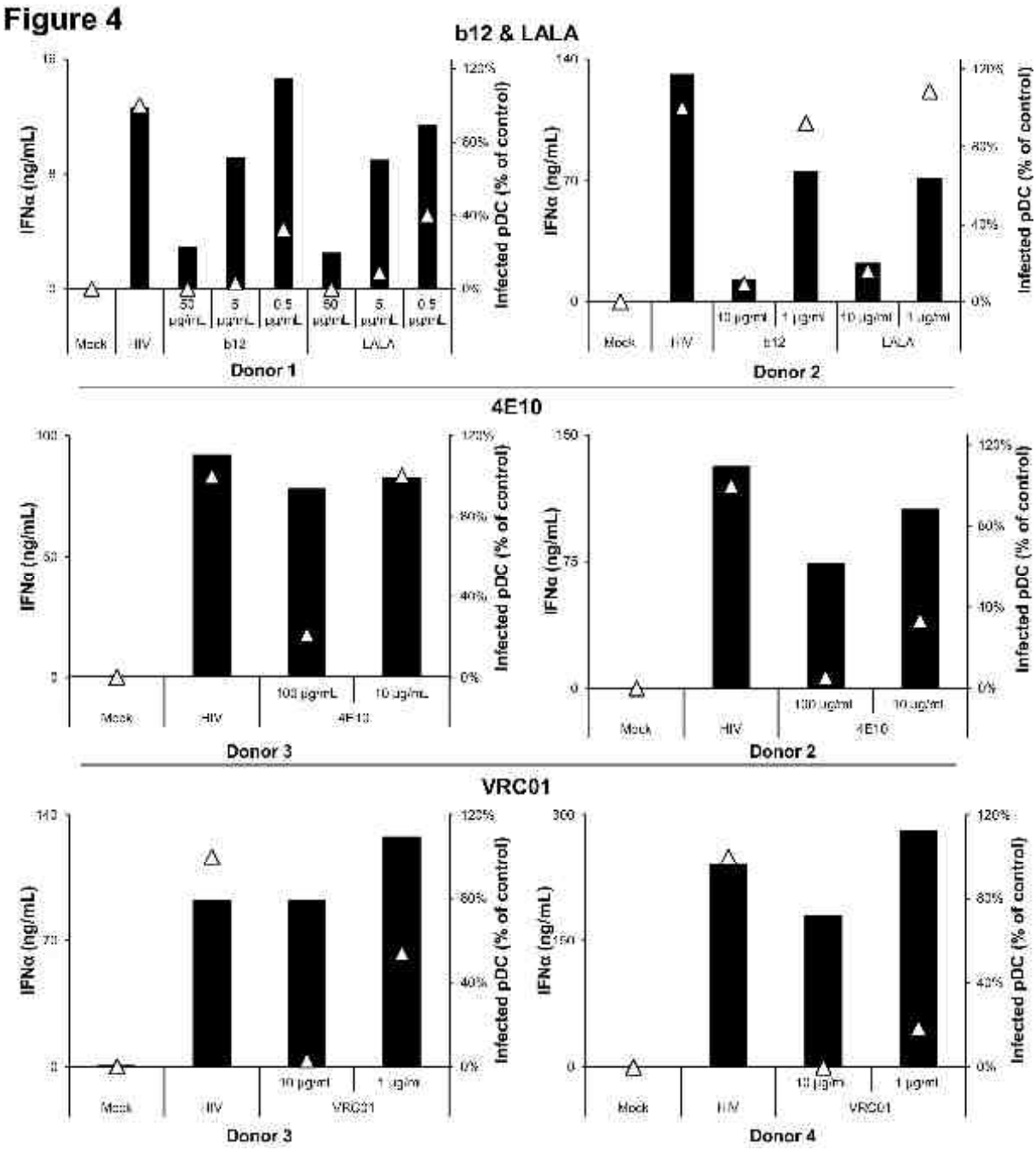


**Figure 4. Production of IFN-α by primary pDC during neutralization assay.** pDC were infected in the presence or absence of different Ab. Supernatants were collected after 48 hours and the concentration of IFN-α was measured by ELISA. IFN-α production (black bars, left axis) is represented when pDC were incubated alone (Mock) or with HIV-$1_{BaL}$ alone (HIV) or with HIV-$1_{BaL}$ in the presence of NAb antibody b12 and LALA (top histograms), 4E10 (middle histograms), and VRC01 (bottom histograms). In parallel, the percentage of infected pDC compared to the control is shown (triangle, right axis). For each row, data are representative of three independent experiments performed on three different healthy donors.

**Figure 5**

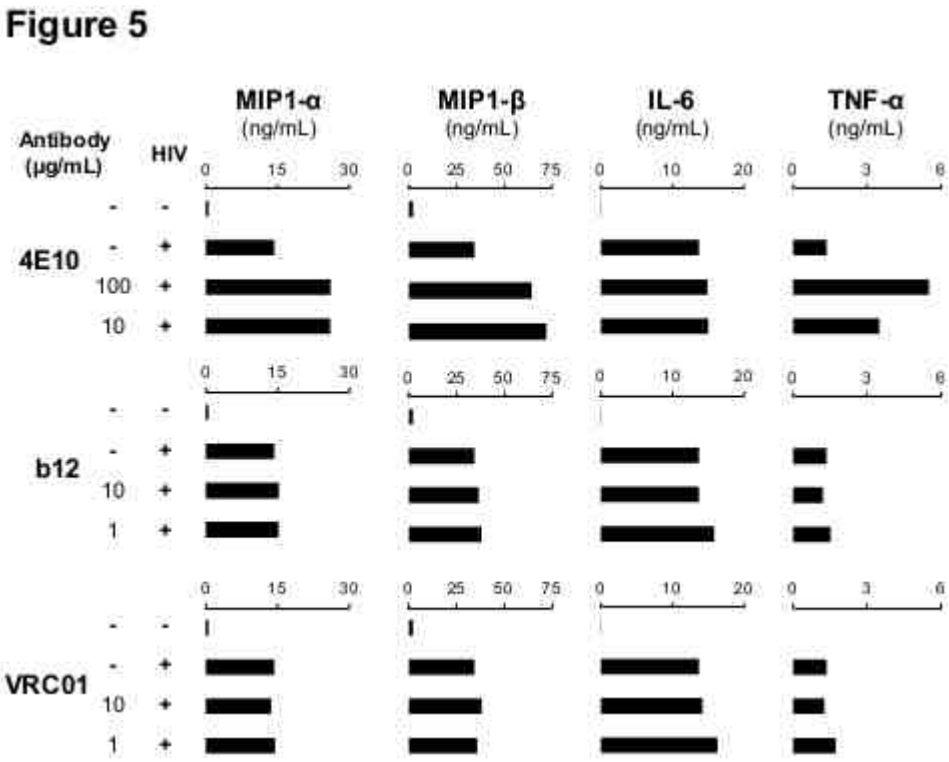



**Figure 5. Production of MIP1-α, MIP1-β, IL-6 and TNFα by primary pDC during neutralization assay.** Supernatants of primary pDC were collected after 48 hours of infection and screened by CBA Flex to measure the MIP1-α, MIP1-β, IL-6 and TNFα production of the primary pDC. The concentration of MIP1-α, MIP1-β, IL-6 and TNFα are represented when primary PDC were incubated alone (Mock) or with HIV-$1_{BaL}$ alone (HIV) or with HIV-$1_{BaL}$ in

the presence of two concentrations of neutralizing antibody 4E10, b12 or VRC01. For each row, data are representative of three independent experiments performed on three different healthy donors.

**Supplementary Figures**

**Supplementary Figure 1**

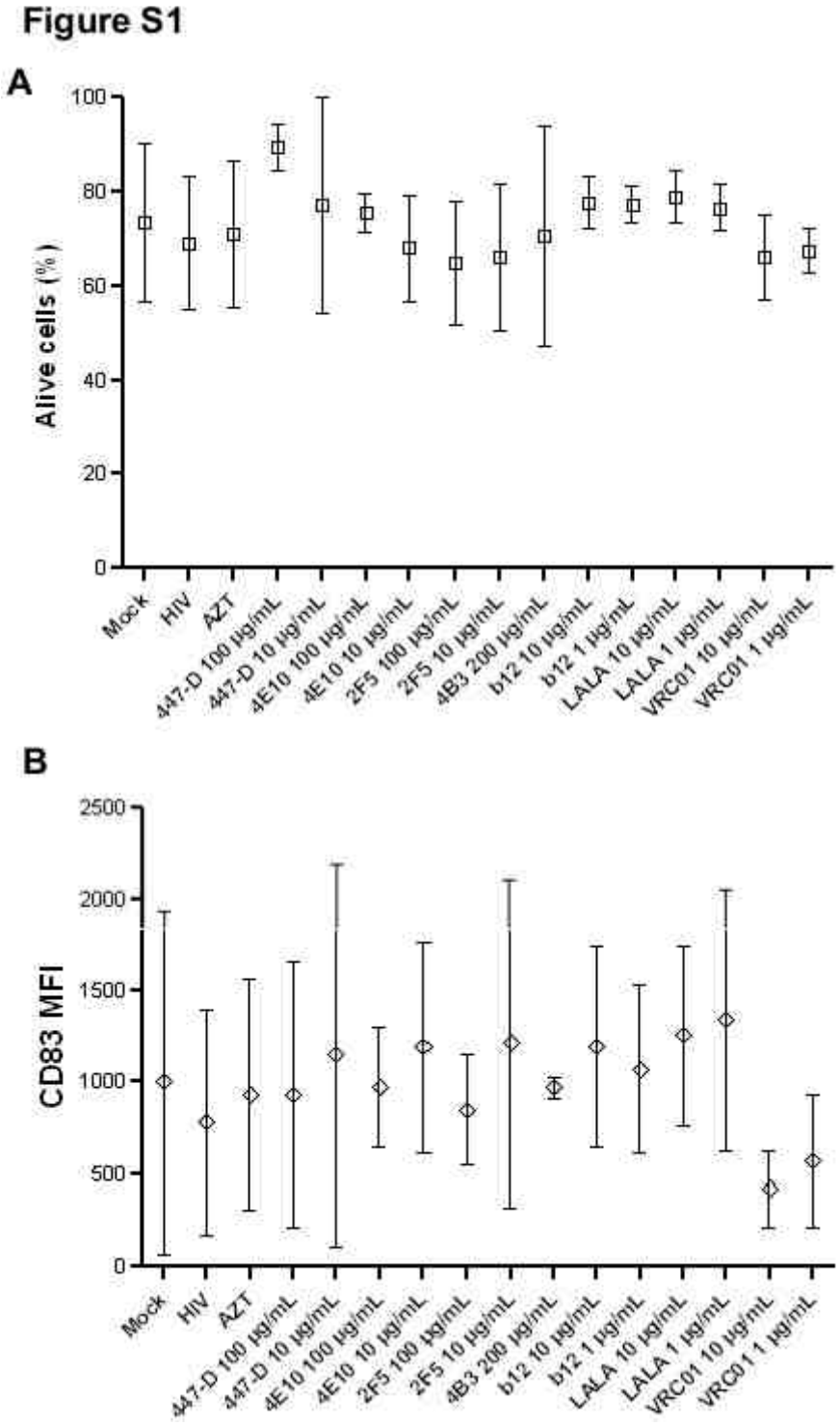



**Figure S1. Viability and maturation of primary pDC during neutralization assay.** A) Primary pDC were stained with Live/Dead to ensure viability of the cells at the end of the neutralization assay. Mean of the percentage of CD123-positive alive cells is represented for

non-infected control (Mock), HIV-$1_{BaL}$ replication (HIV), negative control of HIV-$1_{BaL}$ replication with reverse transcriptase inhibitor AZT (5 µM), and different concentration of anti-HIV antibodies. One-way ANOVA showed no significant difference between all these conditions. B) Maturation of primary pDC was searched by CD83 labeling at the end of the neutralization assay. Mean of the CD83 MFI (mean of fluorescence intensity) is represented for the same conditions as A). One-way ANOVA showed no significant difference between all these conditions. All these results are representative of independent experiments performed on at least three different healthy donors.

**Supplementary Figure 2**

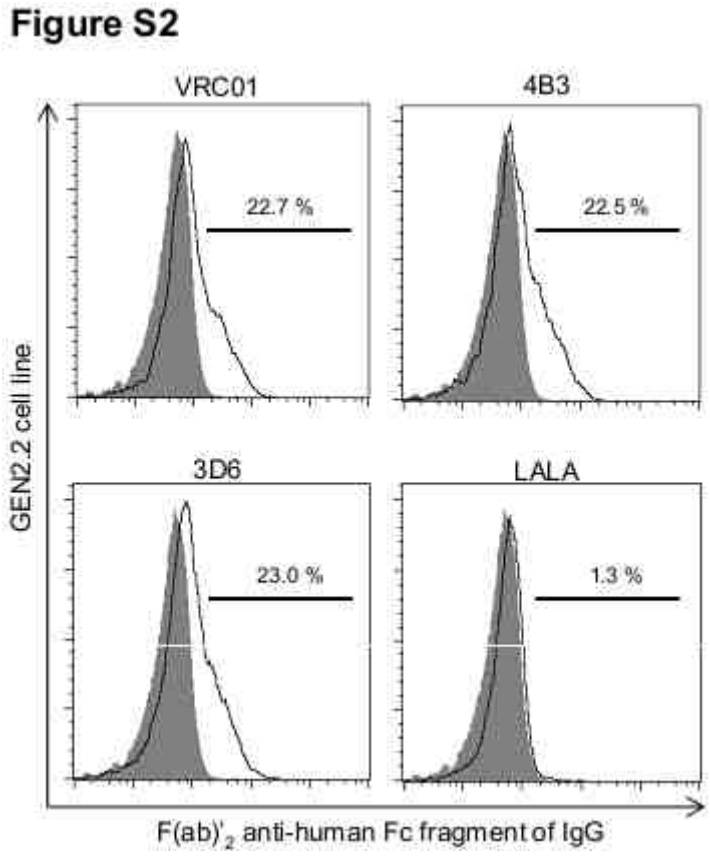



**Figure S2. Anti-HIV-1 antibody binding on GEN2.2 cell line.** GEN2.2 cell line was incubated with 20 µg/mL of NAb VRC01 (top left) or LALA (bottom right), or NNIAb 4B3 (top right), or NNNIAb 3D6 (bottom right). Cells were washed and incubated with Fab'2

antibody against human Fc fragment of IgG. Histograms represent the percentage of anti-HIV antibody binding on GEN2.2 cells (black line) and control without anti-HIV antibody (filled in grey). Data are representative of three independent experiments.

**Supplementary Figure 3**

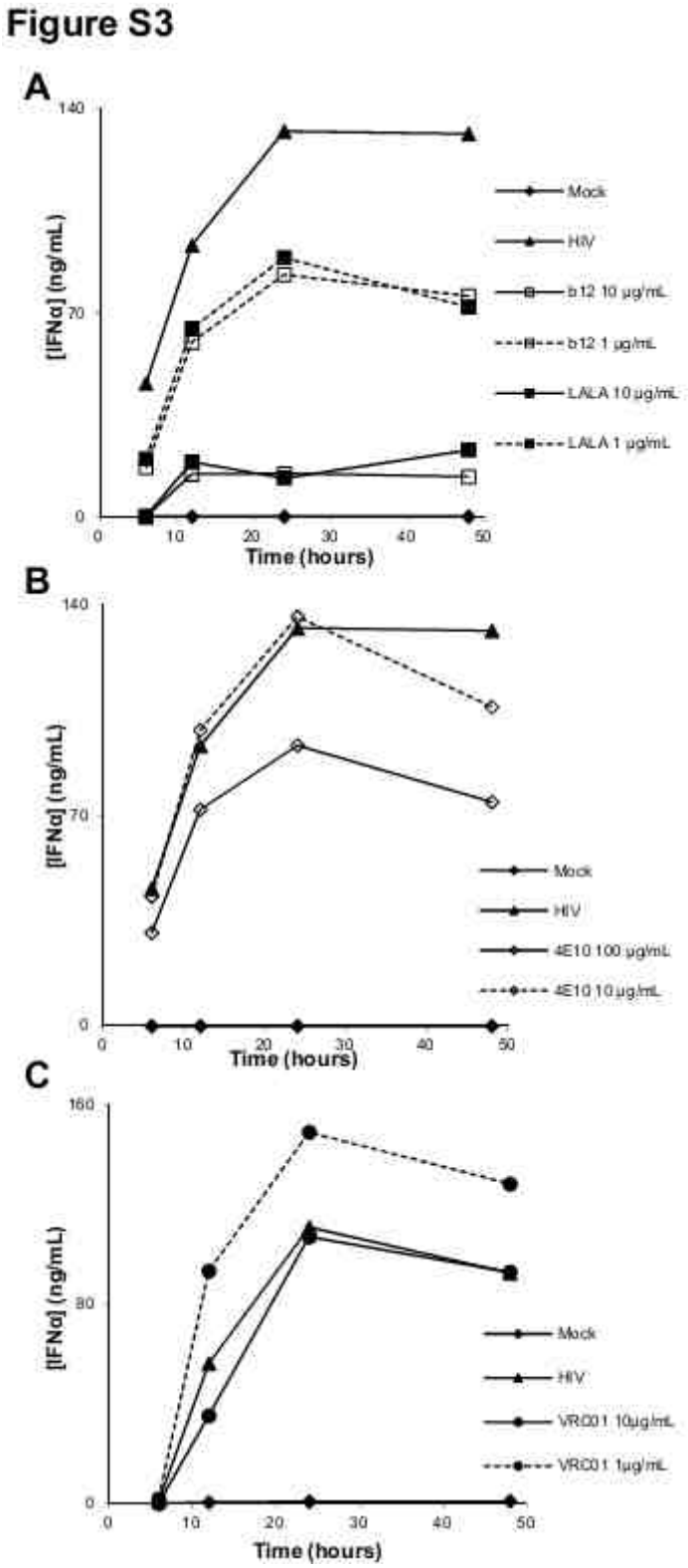



**Figure S3. Kinetics of IFNα production by primary pDC during neutralization assay.** Supernatants were collected at 6, 12, 24 and 48 hours after the beginning of the neutralization assay and screened by ELISA to measure the IFNα production of the primary pDC. The

concentration of IFNα is represented when primary PDC were incubated alone (Mock) or with HIV-$1_{BaL}$ alone (HIV) or with HIV-$1_{BaL}$ in the presence of two concentrations of neutralizing antibody b12 and LALA (A), 4E10 (B), or VRC01 (C). Data are representative of independent experiments performed on three different healthy donors.

**Supplementary Figure 4**

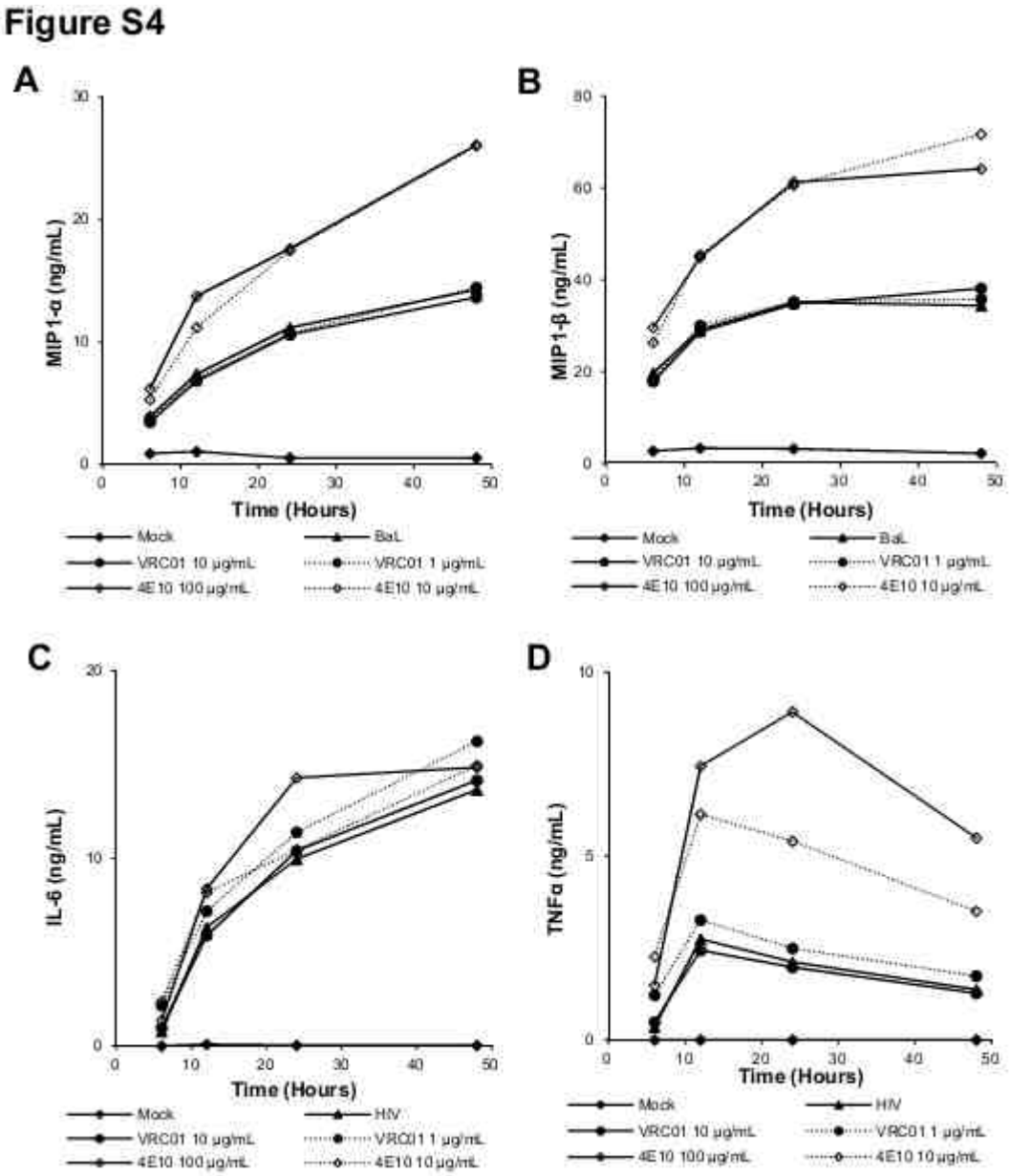



**Figure S4. Kinetics of MIP1-α, MIP1-β, IL-6 and TNFα production by primary pDC during neutralization assay.** Supernatants were collected at 6, 12, 24 and 48 hours after the

beginning of the neutralization assay and screened by CBA Flex to measure the MIP1-α, MIP1-β, IL-6 and TNFα production of the primary pDC. The concentration of MIP1-α (A), MIP1-β (B), IL-6 (C) and TNFα (D) are represented when primary PDC were incubated alone (Mock) or with HIV-$1_{BaL}$ alone (HIV) or with HIV-$1_{BaL}$ in the presence of two concentrations of neutralizing antibody 4E10 or VRC01. Data are representative of independent experiments performed on three different healthy donors.

# Manuscrit 2

## Inhibition du transfert du VIH-1 des cellules dendritiques plasmacytoïdes aux lymphocytes T CD4

Résultats préliminaires présentés en français

Nous avons mis en évidence l'inhibition, par les anticorps neutralisants, de l'infection des pDC par le VIH-1 dans les tests de neutralisation. Cependant, la majorité des infections par le VIH-1 surviennent suite à une transmission par voie sexuelle. Au niveau des muqueuses, les cellules dendritiques (DC) sont les premières cibles du virus et participent à la dissémination du VIH-1 dans l'organisme. Les DC ont été décrites pour leur capacité à capturer le virus et peuvent également propager l'infection via un transfert de cellule à cellule du VIH-1. La suite de mes travaux entreprend d'étudier l'activité inhibitrice d'anticorps sur le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.

Dans cette étude j'ai montré que le VIH-1 est transféré des pDC aux lymphocytes T CD4 en *trans* et en *cis*. En présence de lymphocytes T CD4, le pourcentage de pDC infectées a été augmenté suite à la production *de novo* de virus. L'anticorps neutralisant VRC01 a inhibé le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4, malgré la production de particules virales par les deux populations cellulaires. L'infection des pDC par l'inoculum de VIH-1 a été en partie inhibée par l'anticorps neutralisant VRC01. L'analyse de la viabilité des cellules, de l'état d'activation des cellules et de la production d'IFN-α dans le surnageant a permis de démontrer que ces paramètres n'ont pas influencé l'inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 par l'anticorps VRC01.

Ces travaux démontrent que les anticorps neutralisants sont capables d'inhiber le transfert en trans et en cis du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.

## Matériels et Méthodes

### Isolement des pDC et des lymphocytes T CD4 à partir de sang

Les PBMC (« Peripheral Blood Mononuclear Cells ») sont isolées à partir de concentré cellulaire sanguin (buffy coat) provenant de donneurs séronégatifs (EFS, Strasbourg). Le concentré cellulaire est dilué au ¼ dans du PBS $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ (Phosphate Buffer Saline, Dulbecco) additionné de citrate (9 mM de tri-sodium citrate dihydrate, 1,55 mM d'acide citrique monohydrate), et est déposé sur du Ficoll (Eurobio). Après centrifugation pendant 25 min à 1200 g, les PBMC présente à l'interface Ficoll-PBS sont prélevées et lavées trois fois dans du PBS à 4 °C.

Etant donné l'expression du CD4 par les pDC, ces cellules sont isolées par sélection positive contre BDCA-4 (BDCA-4 isolation kit, Miltenyi Biotec) avant les lymphocytes T CD4. Ensuite, l'isolement des lymphocytes T CD4 est réalisé par sélection positive contre le CD4 (CD4 Microbeads, Miltenyi Biotec). Ces purifications sont réalisées sur un AutoMACS (Miltenyi Biotec).

### Culture cellulaire

Sauf mention contraire, les cellules sont cultivées à 37 °C, 5 % $CO_2$, dans du milieu de culture composé de RPMI 1640 + GlutaMAX™ (GIBCO), 10% SVF décomplémenté (Serum de Veau Fœtal, Eurobio), 100 UI de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine (GIBCO).

Après isolement, les pDC sont cultivées à $1.10^6$ cellules/mL dans du milieu supplémenté de 1 ng/mL d'IL-3 (R&D Systems, Minneapolis, USA) pendant 24 heures avant de procéder aux expériences.

Après isolement, les lymphocytes T CD4 sont stimulés pendant 30 min avec 1 mg/mL de PHA (phytohémagglutinine A, Sigma) à $10.10^6$ cellules/mL dans du milieu. Puis, les cellules sont diluées à $2.10^6$ cellules/mL dans du milieu supplémenté d'IL-2 (10 ng/mL) pendant 24 heures avant de procéder aux expériences.

### Préparation des stocks de VIH-1

Les isolats primaires de VIH sont amplifiés *in vitro* par culture sur un pool de PBMC de trois donneurs séronégatifs différents, préalablement stimulées à la phytohémagglutinine A (PHA, Sigma) (Holl 2006). Les surnageants viraux sont prélevés au pic de production du virus et concentrés par filtration centrifuge (4 °C, 1 heure, 2600 g) en utilisant des filtres de polyethersulfone de 100 kDa (Centricon 70 Plus Biomax filter, Millipore, Molsheim, France). La souche primaire $VIH\text{-}1_{BaL}$ (sous-type B, tropisme R5) est fournie par S. Gatner, M. Popovic, et R. Gallo du National Institute of Health (NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program).

### Anticorps spécifique dirigé contre le VIH-1

L'anticorps monoclonal humain VRC01 dirigé contre la gp120 du VIH-1 a été fourni par J. R. Mascola du Vaccine Research Center (VRC).

**Expérience de transfert du VIH-1**

Les pDC sont lavées et incubées à $6.10^6$ cellules/mL avec la souche primaire de VIH-$1_{BaL}$ à une concentration en p24 de 1 µg/mL. Après 2 heures, les pDC sont lavées extensivement pour retirer toutes les particules virales libres. Les cellules sont resuspendues à $6.10^6$ cellules/mL et 25 µL de pDC pré-incubées avec le VIH-1 sont cultivées avec 25 µL de lymphocytes T CD4 stimulés à la PHA (à $24.10^6$ cellules/mL) et 25 µL d'anticorps monoclonal VRC01 à différentes concentrations. Pour certaines conditions expérimentales, l'inhibiteur de la transcriptase inverse Azidothymidine (AZT) (Sigma) est ajouté à la culture (5 µM) en même temps que les lymphocytes T CD4, afin de prévenir la réplication du VIH-1 et de mesurer la p24 résiduelle en absence de synthèse *de novo* de virions. De même, dans certaines conditions expérimentales, l'inhibiteur de la protéase virale Indinavir (IDV) (AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH) est ajouté à la culture (1 µM) en même temps que les lymphocytes T CD4. L'IDV inhibe la production de particule virale mature infectieuse, permettant ainsi de mesurer l'infection virale sur un unique cycle de réplication. Après 72 heures, les protéines de surface et la protéine p24 du VIH-1 intracellulaire sont marquées afin de caractériser les deux populations cellulaires et de déterminer le pourcentage de cellules infectées par cytométrie en flux.

**Immunophénotypage et analyse par cytométrie en flux**

Les cellules sont incubées avec le kit Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain (Invitrogen Life Science, Applied Biosystems Inc. California, Etats-Unis) pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite, les anticorps monoclonaux fluorescents murins dirigés contre les déterminants cellulaires humains CD3-VioBlue (BW264/56, Miltenyi Biotec), CD86-PE (FUN-1, BD Pharmingen), CD123-PeCy5 (9F5, BD Pharmingen), CD69-PeCy7 (FN50, BD Pharmingen), CD83-APC (HB15, Miltenyi Biotec) sont incubés avec les cellules pendant 10 minutes à 4 °C. Après fixation au Cytofix (BD Biosciences) et perméabilisation au Perm/Wash (BD Biosciences), l'antigène viral intracellulaire p24 est marqué avec l'anticorps monoclonal murin anti-HIV Core protein p24-FITC (KC57, Beckman Coulter, Roissy, France). L'acquisition des échantillons est réalisée sur un cytomètre LSRII SORP (BD Biosciences) calibré par billes CST (Cytometer Setup & Tracking, BD Biosciences) pour assurer la qualité et la cohérence des mesures entre les différentes expériences. Les compensations sont réalisées en utilisant le kit CompBeads (BD Biosciences). Les doublets cellulaires sont exclus via les paramètres de taille Forward Scatter Width et Forward Scatter Area, et les cellules mortes sont exclues par le marquage Live/Dead. L'analyse des résultats est effectuée avec le logiciel FACSDiVa version 6.1.2 (BD Biosciences).

**Analyse de la production cytokinique**

Au terme des expériences de transfert, le surnageant cellulaire est collecté pour analyser la production cytokinique. La production d'IFN-α est mesurée par ELISA Verikine Human Interferon Alpha MultiSubtype (PBL InterferonSource, New Jersey, Etats-Unis).

**Analyse statistique**

Les comparaisons entre groupes ont été analysées par ANOVA à un facteur (test de Kruskall-Wallis) et par test t (test de Wilcoxon). Les valeurs de $p<0.05$ ont été considérées comme statistiquement significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5.04 (GraphPad, San Diego, Californie, USA).

## Résultats

### Infection productive des pDC et des lymphocytes T CD4 lors du transfert

Le test de transfert a été mis au point sur la base des tests de transfert développé au laboratoire (Publication 1 et Manuscrit 3). Les pDC sont incubées deux heures avec le VIH-1, puis sont lavées extensivement pour éliminer tous le virus libre. Ces pDC chargées en VIH-1 (nommées dans le reste du chapitre « VIH-1-pDC ») sont ajoutés aux lymphocytes T CD4 activés à la PHA. Après 72 heures, les cellules sont analysées par cytométrie en flux selon une stratégie d'analyse décrite dans la figure 1. Après exclusion des doublets et sélection des évènements par la taille (FSC) et la granularité (SSC) (figure 1A, en haut à droite), les pDC sont séparées des lymphocytes T CD4 selon le niveau d'expression du CD123 : les pDC sont $CD123^{+}$, et les lymphocytes T CD4 sont $CD123^{-}$ (figure1A, au mileu à droite). La sélection des lymphocytes T CD4 est affinée par l'analyse de l'expression du CD3 : les lymphocytes T CD4 sont les évènements $CD3^{+}/CD123^{-}$ (figure 1A, au milieu à gauche). La viabilité des deux populations cellulaires est ensuite mesurée à l'aide du marquage au Live/Dead (figure 1A, en bas). Après 72h, le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 est détecté (3.5 % des lymphocytes T CD4 sont $p24^{+}$) (figure 1B, au milieu à gauche), parallèlement à l'infection des pDC (12.6 % des pDC sont $p24^{+}$) (figure 1B, au milieu à droite). Ces résultats correspondent à la production *de novo* de VIH-1 puisque, en présence de l'inhibiteur de la transcriptase inverse AZT, le pourcentage d'infection des lymphocytes T CD4 et des pDC est de 0.1 % et 0.2 %, respectivement (figure 1B, en bas à gauche et à droite). L'analyse cytométrique de la co-culture de cellules en absence de VIH-1 est représentée à titre de contrôle (figure 1B en haut). Ces résultats montrent que l'analyse par cytométrie en flux permet de discriminer les deux populations cellulaires et de mesurer le pourcentage d'infection par le VIH-1 dans chacune de ces populations.

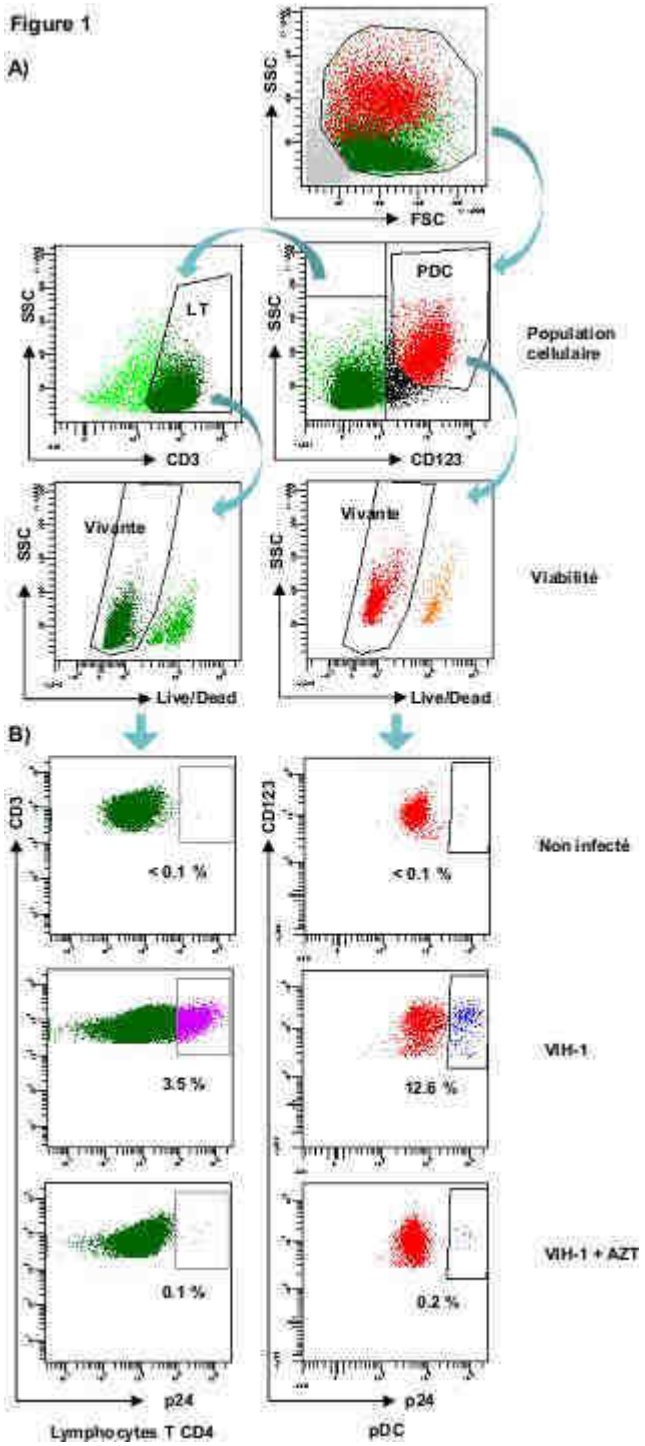



**Figure 1 : Détection de la p24 virale dans les pDC et les lymphocytes T CD4 activés à la PHA.**
A) Après exclusion des doublets et sélection des évènements par la taille (FSC) et la structure (SSC) (en haut à droite), les deux populations cellulaires sont discriminées par l'expression du CD123 et du CD3 : les pDC sont $CD123^+$ (au milieu à droite) et les lymphocytes T CD4 sont $CD123^-/CD3^+$ (au milieu). La viabilité de chaque population cellulaire est mesurée par Live/Dead (en bas). B) Le pourcentage de lymphocytes T CD4 (à droite) et de pDC (à gauche) infectées est mesuré par détection de la p24. Les contrôles négatifs en absence de virus (en haut) et en présence d'inhibiteur de la transcriptase inverse AZT (en bas) sont réalisés en parallèle de l'infection (au milieu).

**Transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4**

Afin d'analyser le transfert en *trans*, les VIH-1-pDC sont incubées avec les lymphocytes T CD4 activés à la PHA en présence d'Indinavir (IDV). L'IDV est un inhibiteur de protéase permettant de bloquer la maturation de la particule virale. Ainsi aucune particule virale néo-synthétisée ne pourra infecter productivement une cellule. La production *de novo* de virus n'est donc pas mesurée par marquage intracellulaire de la p24 et seule la p24 issue de la réplication de l'inoculum, c'est-à-dire les virions incubés pendant 2 heures avec les pDC, est détectée. Dans ces conditions, un lymphocyte T CD4 positif pour la p24 ne peut avoir été infecté que par un virus ne s'étant pas répliqué dans la pDC. Le schéma ci-dessous représente la réplication du virus dans en absence et en présence d'IDV.

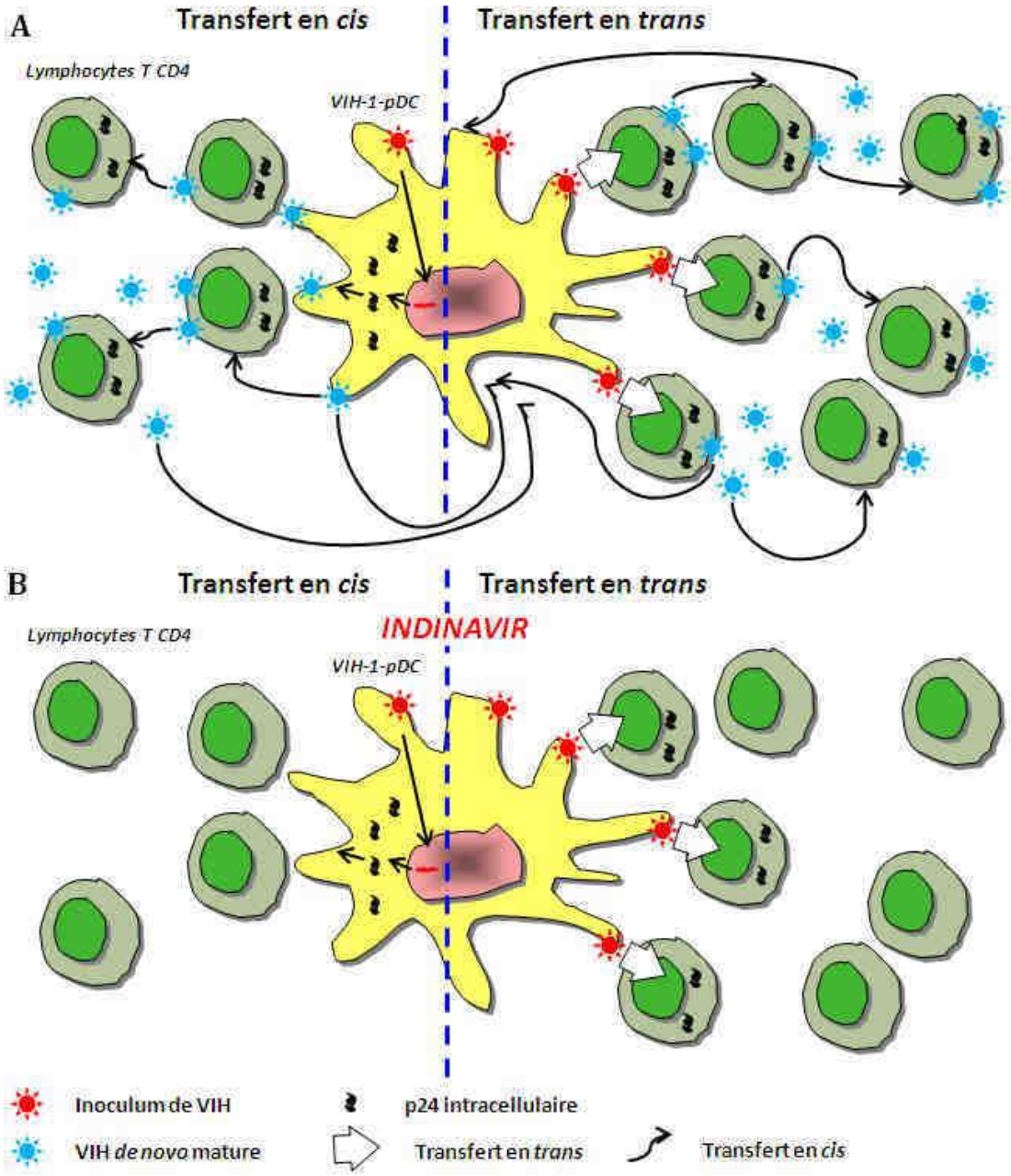


**Schéma : Analyse du transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.**
A, L'inoculum viral (en rouge) présent à la surface des pDC (en jaune) peut infecter productivement les pDC (à gauche) qui à leur tour produisent *de novo* des particules virales (en bleues) infectant les lymphocytes T CD4 ou les pDC non infectées (Transfert en *cis*, à gauche). L'inoculum viral présent à la surface des pDC peut être transférer aux lymphocytes T CD4 sans s'être préalablement répliqué dans les pDC (Transfert en *trans*, à droite). L'inoculum viral se répliquant dans les lymphocytes T CD4 amène à la production *de novo* de virus qui à leur tour peuvent infecter (en *cis*) d'autres lymphocytes T CD4 ou pDC non infecté(e)s. B, En présence d'indinavir, la production *de novo* de virion mature est inhibée, et seule l'infection productive des pDC (à gauche) ou le transfert en *trans* aux lymphocytes T CD4 (à droite) peuvent se produire. Dans ces conditions, la détection de la p24 intracellulaire rend uniquement compte de la réplication issue de l'inoculum viral.

### *Dynamique de réplication du VIH-1 dans les pDC*

La réplication du VIH-1 dans les pDC a été analysée en absence et en présence des lymphocytes T CD4. Pour déterminer si le VIH-1 se réplique au cours d'un cycle unique, l'inhibiteur de la protéase virale Indinavir (IDV) a été ajouté à la culture après les deux d'incubation des pDC avec le VIH-1. En absence de lymphocytes T CD4, le pourcentage d'infection des VIH-1-pDC est similaire en présence ou en absence d'IDV, démontrant que le VIH-1 se réplique dans les pDC au cours d'un cycle unique de réplication (figure 2). En présence de lymphocytes T CD4, le pourcentage d'infection des VIH-1-pDC augmente 1.4 fois par rapport au pourcentage d'infection des VIH-1-pDC en absence des lymphocytes T CD4 (figure 2). En présence de lymphocytes T CD4 et d'IDV, le pourcentage d'infection des VIH-1-pDC est similaire à celui mesuré lorsque les VIH-1-pDC sont incubées seules en présence d'IDV (figure 2). Ces résultats suggèrent que l'augmentation du pourcentage d'infection des VIH-1-pDC en présence des lymphocytes T CD4 n'est pas du à l'inoculum viral de départ, mais proviendrait d'un second cycle de réplication du VIH-1 dans la co-culture infectant les pDC.

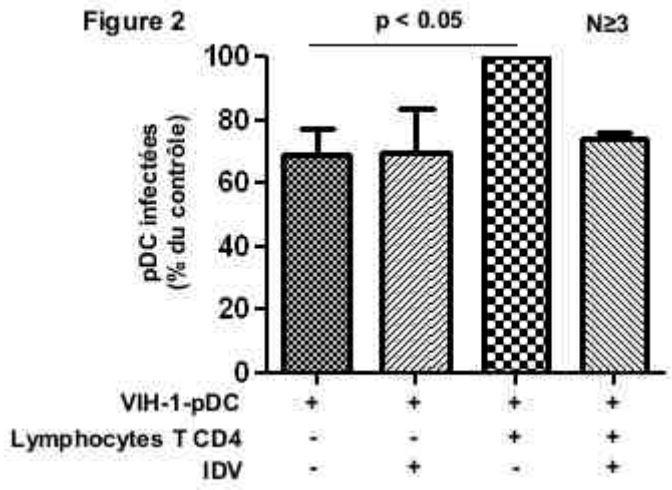



**Figure 2 : Réplication du VIH-1 dans les pDC.**

Le pourcentage d'infection des pDC par rapport au contrôle (culture des VIH-1-pDC avec les lymphocytes T CD4) est représenté pour les VIH-1-pDC incubées seules ou incubées avec les lymphocytes T CD4, en présence ou en absence de l'inhibiteur de protéase Indinavir (IDV). Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± écart-type et sont issus d'expériences indépendantes menées sur un minimum de trois donneurs sains. Les comparaisons par paires ont été analysée par test t (test de Wilcoxon), et les $p<0.05$ ont été considérées significative.

### *Dynamique de réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4*

En présence de VIH-1-pDC, la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4 activés à la PHA a été analysée en présence et en absence d'IDV. En présence d'IDV, le pourcentage d'infection des lymphocytes T CD4 diminue environ de moitié par rapport au pourcentage d'infection en absence de l'inhibiteur de protéase (figure 3). Ces résultats montrent que l'infection des lymphocytes T CD4 provient pour moitié du transfert en *trans* du VIH-1 des pDC et pour moitié du transfert en *cis* de particules virales produites soit par les lymphocytes T CD4 soit par les pDC.

Figure 3

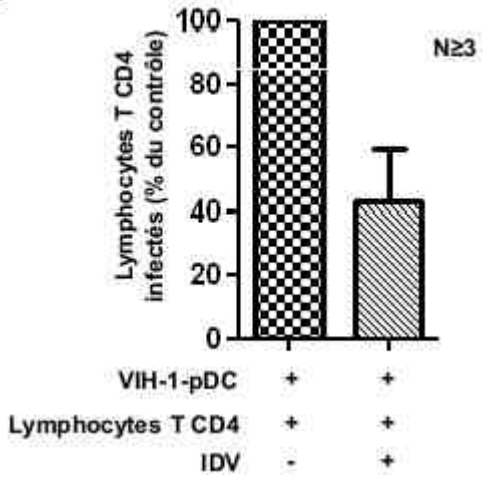



**Figure 3 : Réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4 stimulés à la PHA.**
Le pourcentage d'infection des lymphocytes T CD4 par rapport au contrôle (culture des lymphocytes T CD4 avec les VIH-1-pDC) est représenté pour les lymphocytes T CD4 incubés avec les VIH-1-pDC, en présence ou en absence de l'inhibiteur de protéase Indinavir (IDV). Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± écart-type et sont issus d'expériences indépendantes menées sur un minimum de trois donneurs sains.

L'ensemble de ces résultats montrent que ces conditions expérimentales nous permettent d'analyser l'inhibition du transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 par les anticorps.

**Inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4**

***Inhibition du transfert du VIH-1 en* cis *et en* trans**

L'inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 a été étudiée en ajoutant l'AcN VRC01 après les deux heures d'incubation des pDC avec le VIH-1, au même moment que les lymphocytes T CD4. En présence de 20 et 2 µg/mL de VRC01 dans la co-culture, le pourcentage d'infection des VIH-1-pDC n'a diminué que de 20 %, démontrant une très faible efficacité de VRC01 à inhiber l'infection des pDC deux heures après l'incubation avec le VIH-1 (figure 4A). En revanche, l'infection des lymphocytes T CD4 dans les conditions de transfert est inhibée d'environ 50 % en présence de 2 µg/mL de VRC01, et cette inhibition est d'environ 90 % en présence de 20 µg/mL de VRC01 (figure 4B). Ces résultats démontrent que l'AcN VRC01 est capable d'inhiber le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.

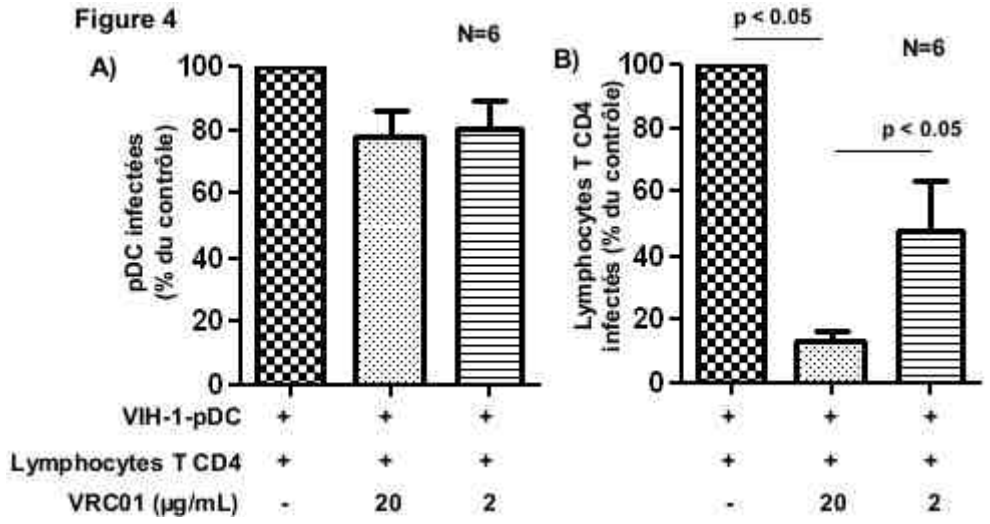



**Figure 4 : Inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.**

Le pourcentage d'infection des pDC et des lymphocytes T CD4 par rapport au contrôle est représenté respectivement pour les VIH-1-pDC (A) et les lymphocytes T CD4 (B) en condition de transfert, en présence ou en absence de l'AcN VRC01 à 20 et 2 µg/mL. Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± écart-type et sont issus d'expériences indépendantes menées sur six donneurs sains. Les comparaisons par paires ont été analysée par test t (test de Wilcoxon), et les $p<0.05$ ont été considérées significative.

Les résultats précédents ont permis de montrer que le VIH-1 se réplique sur plus d'un cycle dans les cellules de la co-culture. Afin de déterminer à quelle étape du cycle de réplication viral agit l'AcN VRC01, les VIH-1-pDC ont été incubées avec les lymphocytes T CD4 en présence de 20 µg/mL de VRC01 et d'IDV. Ainsi l'inhibition de l'infection observée en présence d'IDV et de VRC01 correspond à l'inhibition du premier cycle de réplication du virus (inoculum viral), c'est-à-dire le transfert en trans du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4. Le pourcentage d'infection

des VIH-1-pDC en présence de 20 µg/mL de VRC01 et d'IDV est plus faible que le traitement à l'IDV seul ou avec VRC01 seul (figure 5A). De manière intéressante, la diminution du pourcentage d'infection des VIH-1-pDC provoquée par l'AcN VRC01 est d'environ 25 % en présence ou en absence d'IDV : le pourcentage d'infection des VIH-1-pDC diminue de 100 à environ 77 % en absence d'IDV, et de 74 à 46 % en présence d'IDV. Ces résultats suggèrent qu'une partie du virus présent à la surface des pDC ne s'est pas fixé à son récepteur CD4, permettant à VRC01 d'agir même après deux heures. Par ailleurs, VRC01 a inhibé le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 de manière similaire en présence et en absence d'IDV, démontrant que VRC01 est capable d'inhiber à la fois le transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 (figure 5B).

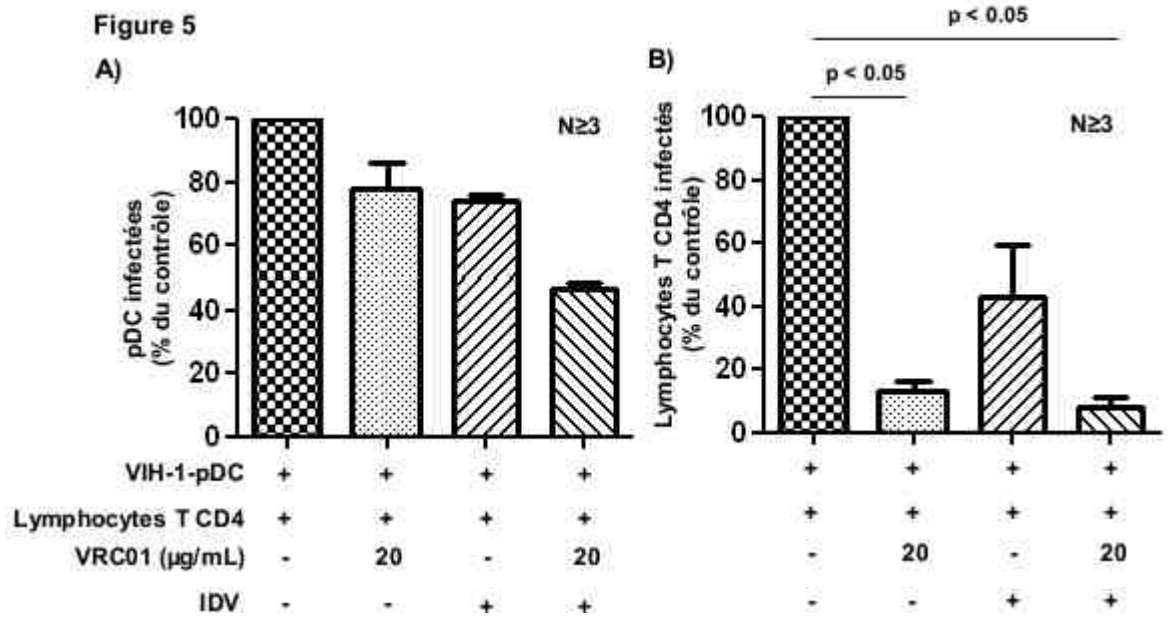



**Figure 5 : Inhibition du transfert en *trans* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.**
Le pourcentage d'infection des pDC et des lymphocytes T CD4 par rapport au contrôle est représenté respectivement pour les VIH-1-pDC (A) et les lymphocytes T CD4 (B) en condition de transfert, en présence ou en absence de l'AcN VRC01 à 20 µg/mL et en présence ou en absence d'IDV. Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± écart-type d'expériences indépendantes menées sur au moins trois donneurs sains. Les comparaisons par paires ont été analysée par test t (test de Wilcoxon), et les $p<0.05$ ont été considérées significative.

Ces résultats montrent que les anticorps neutralisants sont capables d'inhiber le transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.

***Viabilité et phénotype cellulaire dans le transfert du VIH-1***

Dans les conditions de transfert, l'AcN VRC01 a été ajouté au même moment que les lymphocytes T CD4 activés à la PHA avec les VIH-1-pDC. Dans un premier temps, la viabilité et le phénotype des cellules a été analysé dans la co-culture. Le pourcentage de pDC vivantes dans la co-culture

n'a pas varié entre les différentes conditions expérimentales, pouvant aller de 50 % à 100 % de cellules vivantes, excepté lorsque le VIH-1 n'a pas été incubé avec les pDC (30 à 100 %) (figure 6A). En revanche, le pourcentage de lymphocytes T CD4 vivants est resté très élevé (environ 95 %) dans toutes les conditions experimentales, même en absence de VIH-1 (figure 6B). Ces résultats suggèrent que le VIH-1 et/ou l'AcN VRC01 n'induisent pas spécifiquement la mortalité cellulaire des pDC ou des lymphocytes T CD4.

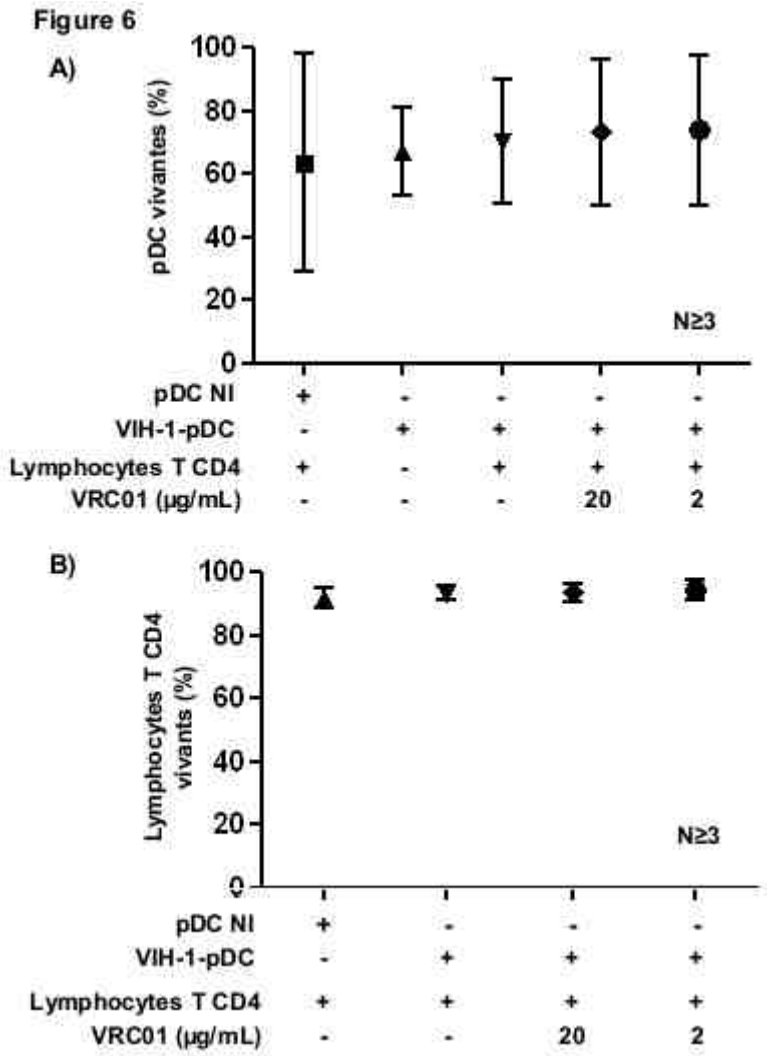



**Figure 6 : Viabilité des pDC aux lymphocytes T CD4.**

Le pourcentage de pDC vivantes (A) et des lymphocytes T CD4 vivants (B) après 72 heures est représenté pour différentes conditions de coculture. Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± erreur standard d'expériences indépendantes menées sur au moins trois donneurs sains. Les comparaisons de groupes ont été analysée par ANOVA à un facteur (test de Kruskall-Wallis), et les $p<0.05$ ont été considérées significative.

Dans les mêmes conditions expérimentales, le phénotype des pDC et des lymphocytes T CD4 a été analysé. Dans les différentes conditions expérimentales, l'expression du marqueur de maturation CD83 a été faible et n'a pas varié en présence ou en absence de lymphocytes T CD4,

et en présence ou en absence de l'AcN VRC01 (figure 7A). De même, le pourcentage de pDC exprimant le CD69 (marqueur d'activation) est similaire (figure 7B). En revanche, le pourcentage d'expression de la molécule de co-stimulation CD86 à la surface des pDC est augmenté en présence des lymphocytes T CD4 en absence ou en présence de VRC01, comparé aux VIH-1-pDC seules, passant de 10 à 40 % environ (figure 7C). En absence de VIH-1, le pourcentage de pDC CD86$^+$ en co-culture avec les lymphocytes T CD4 est également faible (environ 10 %) (données non représentées).

Figure 7

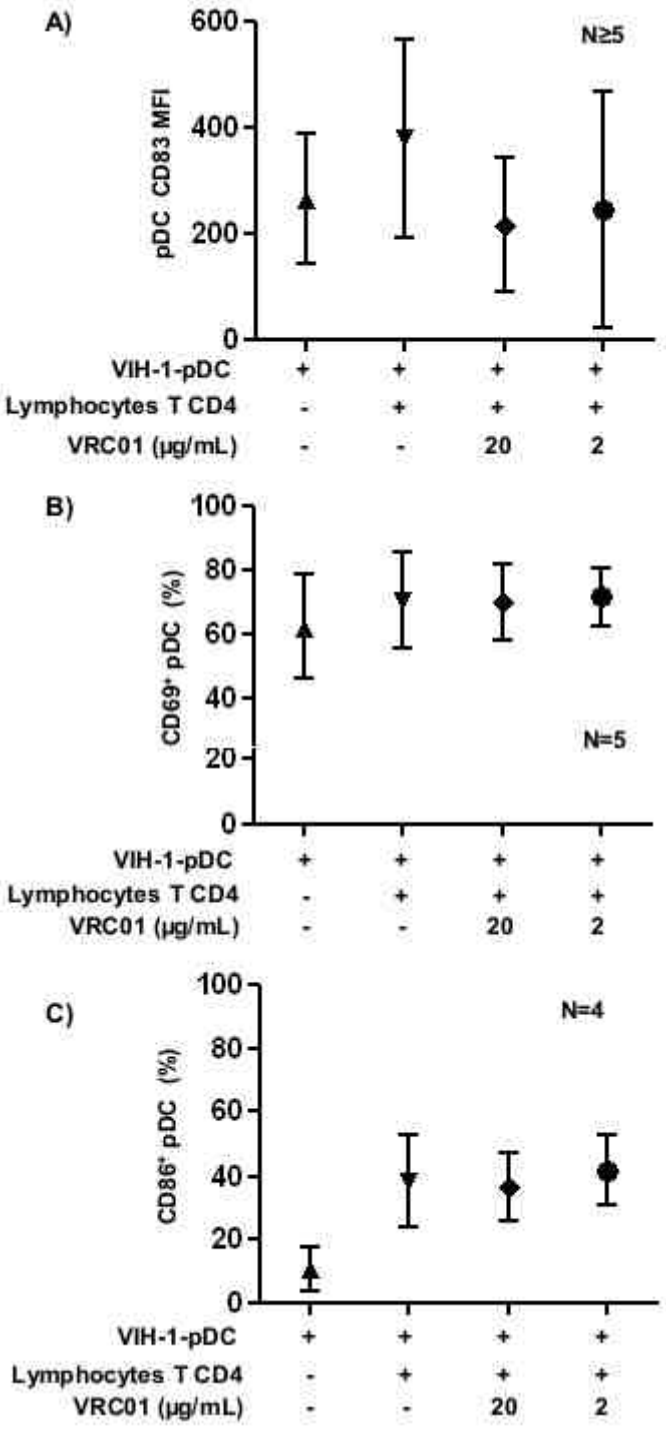


**Figure 7 : Phénotype des pDC au cours du transfert du VIH-1.**

A) L'expression du marqueur de maturation CD83 à la surface des pDC après 72 heures est représenté pour différentes conditions de coculture par la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) mesurée. Le pourcentage de pDC exprimant le marqueur d'activation CD69 (B) ou le CD86 (C) après 72 heures est représenté pour différentes conditions de coculture. Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± erreur standard d'expériences indépendantes menées sur cinq (A et B) ou quatre (C) donneurs sains. Les comparaisons de groupes ont été analysée par ANOVA à un facteur (test de Kruskall-Wallis), et les $p<0.05$ ont été considérées significative.

Par ailleurs, l'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des lymphocytes T CD4 n'est pas différente lorsque les lymphocytes T CD4 sont incubés avec les VIH-1-pDC en présence ou en absence de VRC01 (environ 32 %) (figure 8). Néanmoins lorsque les lymphocytes T CD4 sont incubés seuls, le pourcentage de cellules exprimant le CD69 est d'environ 12 %, et l'incubation des lymphocytes T CD4 avec du VIH-1 libre entraîne l'expression de ce marqueur sur environ 25 % des cellules (figure 8), suggérant que l'activation des lymphocytes T CD4 dans les conditions de transfert serait due en partie au VIH-1 et en partie au pDC.

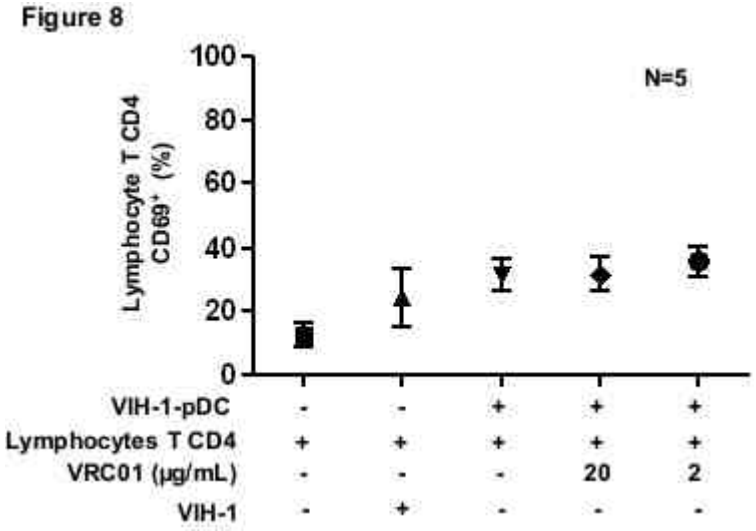



**Figure 8 : Phénotype des lymphocytes T CD4 au cours du transfert du VIH-1.**

Le pourcentage de lymphocytes T CD4 exprimant le marqueur d'activation CD69 après 72 heures est représenté pour différentes conditions de coculture. Ces résultats sont exprimés comme une moyenne ± erreur standard d'expériences indépendantes menées sur cinq donneurs sains. Les comparaisons de groupes ont été analysée par ANOVA à un facteur (test de Kruskall-Wallis), et les $p<0.05$ ont été considérées significative.

Ces résultats montrent une activation des pDC (expression du CD86 et du CD69) et des lymphocytes T CD4 (expression du CD69) dans les conditions de transfert du VIH-1. La maturation des pDC est partielle puisque l'expression du CD83 n'est pas augmentée après les 72 heures de culture dans les expériences de transfert.

Le maintien de la viabilité et du phénotype cellulaire dans la co-culture de VIH-1-pDC et de lymphocytes T CD4 en absence et en présence de VRC01 démontre que l'inhibition du transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 par l'AcN VRC01 est indépendante de la mortalité ou de l'état d'activation des cellules de la co-culture.

***Production d'interféron-α dans le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4***

Les pDC sont capables de produire de fortes quantités d'IFN- α aux propriétés antivirales. La présence de cette cytokine dans la co-culture de VIH-1-pDC et de lymphocytes T CD4 a été mesuré dans le surnageant des expériences de transfert, à la fin des 72 heures. Aucune production d'IFN-α n'a pu être détectée dans le surnageant de lymphocytes T CD4 seuls, incubés ou non avec du VIH-1 libre. De même, la co-culture de pDC non-infectées avec les lymphocytes T CD4 n'a pas induit de production d'IFN-α (données non-représentées). En revanche, une production d'IFN-α a été détecté dans le surnageant des pDC incubées 2 heures avec le VIH-1 puis lavées (figure 9). De plus, dans les surnageants de VIH-1-pDC incubées avec les lymphocytes T CD4, la production d'IFN-α mesurée était plus importante par rapport aux VIH-1-pDC cultivées seules, et ce pour trois donneurs sains distincts (figure 9). La présence de VRC01 dans ces expériences de transfert ne modifie pas la production d'IFN-α par rapport à celle mesurée dans la co-culture en absence de VRC01 (figure 9).

Figure 9

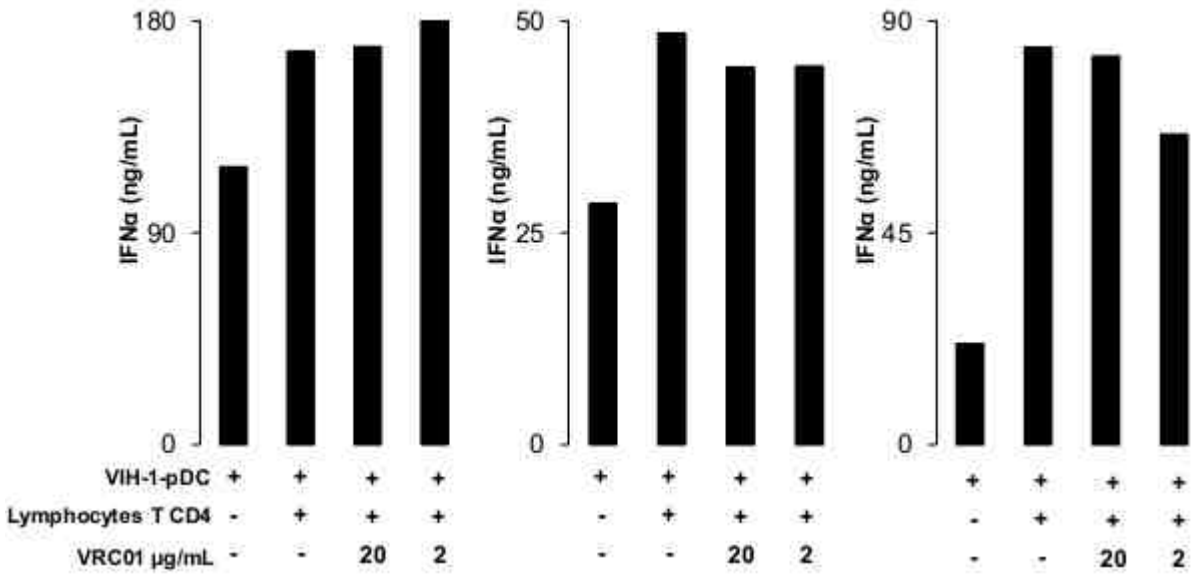



**Figure 9 : Production d'IFN-α dans le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.**
La production d'IFN-α a été mesurée par ELISA dans les surnageants de co-culture après 72 heures. La concentration en IFN-α (ng/mL) est représentée pour les VIH-1-pDC incubées seules ou avec les lymphocytes T CD4 en présence ou en absence de l'AcN VRC01 à 2 et 20 µg/mL, et ce pour trois donneurs sains (graphiques de gauche, milieu et droite).

Bien que le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 soit inhibé par VRC01, la

production d'IFN-α n'est pas modifiée par la présence de l'Ac, démontrant que l'inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes CD4 est indépendante de la production d'IFN-α dans la co-culture.

**Discussion et Perspective**

Les cellules dendritiques (DC) ont été décrites pour leur capacité à capturer le VIH-1 et à le transférer aux cellules cibles du virus (Piguet et al., 2007; Cavrois et al., 2007). Ce modèle de propagation de cellule-à-cellule du VIH-1 est considéré comme très efficace, permettant la dissémination du virus dans l'organisme (Hladik and McElrath, 2008 ; Pope and Haase, 2003). En absence de pathogène, les pDC sont peu nombreuses au niveau des muqueuses, mais une étude sur le modèle pathogène du SIV a montré qu'en présence du virus un grand nombre de pDC est recruté au niveau de la muqueuse (Li et al., 2009). De plus, deux études ont démontré que les pDC pouvaient transférer le VIH-1 aux lymphocytes T CD4 (Lore et al., 2005 ; Fong et al., 2002). Dans ces conditions, il apparaît essentiel de déterminer si les anticorps neutralisants sont capables d'inhiber le transfert du VIH-1 aux lymphocytes T CD4.

Nous avons mis au point un protocole de transfert du VIH-1 permettant d'analyser la réplication du VIH-1 dans les pDC et les lymphocytes T CD4. Le traitement avec l'inhibiteur de protéase Indinavir (IDV) a permis de démontrer que ce transfert se produit en *trans* et en *cis*. L'infection des lymphocytes T CD4 et des pDC dans les conditions de transfert a été le résultat de plus d'un cycle de réplication du virus. Aussi, nous avons démontré que la réplication du VIH-1 dans les pDC était augmentée en présence de lymphocytes T CD4 comparé aux pDC incubées seules avec le VIH-1. Cette augmentation de la réplication du VIH-1 en présence de lymphocytes T CD4 a également été observée dans les MoDC et dans les LC et intDC (Publication 1). L'augmentation de la réplication du VIH-1 dans les MoDC s'est révélée être dépendante du contact direct entre ces cellules et les lymphocytes T CD4. Aussi, l'importance des contacts entre les VIH-1-pDC et les lymphocytes T CD4 dans l'augmentation de la réplication du VIH-1 pourra être évaluée par des expériences en trans-well permettant d'isoler les deux populations cellulaires tout en laissant passer le virus ou les cytokines.

Les travaux menés sur le transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4 ont permis de montrer qu'en présence de lymphocytes T CD4 non stimulés, donc incapables de répliquer le VIH-1, la réplication du VIH-1 est augmentée dans les MoDC (Publication 1). De plus, la réplication du VIH-1 dans les MoDC en co-culture avec les lymphocytes T CD4 stimulés à la PHA est principalement issue de l'inoculum viral et ne représente presque qu'un seul cycle de réplication (Manuscrit 3). Néanmoins, le traitement avec l'IDV a permis de démontrer que l'augmentation de la réplication du VIH-1 dans les pDC n'était pas due à une stimulation de l'infection par l'inoculum viral, mais qu'un second cycle de réplication du VIH-1 était responsable de cette augmentation. Les origines de cette augmentation de la réplication du VIH-1 pourraient être multiples. En effet, le VIH-1 nouvellement produit qui infecte les pDC pourrait être issu des pDC elles-mêmes ou des lymphocytes T CD4. Ainsi, l'étude des mécanismes mis en jeu dans la

stimulation de la réplication du VIH-1 dans les pDC pourraient être approfondi en déterminant plus précisément si l'augmentation du nombre de pDC infectées est le résultat du virus produit par ces cellules ou par du virus produit par les lymphocytes T CD4. De même, l'importance du ratio entre lymphocytes T CD4 et VIH-1-pDC, ainsi que la concentration de cellules totales dans la coculture pourront être évaluées puisque l'augmentation de la réplication pourrait être due à une fréquence plus élevée de contact entre cellules favorisant ainsi leur infection.

Nous avons montré que l'AcN VRC01 est capable d'inhiber le transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4. Cette inhibition de la réplication du VIH-1 dans les conditions de transfert s'est révélée être indépendante de la viabilité des cellules, de leur état d'activation ou de maturation, et de la production d'IFN-α. De plus, l'inhibition de ce transfert est dépendante de la concentration en AcN puisqu'une concentration dix fois inférieure de VRC01 a été moins efficace. Bien que certains groupes, le nôtre y-compris, aient observés une inhibition du transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4 par les Ac spécifiques du VIH-1 (Cavrois et al., 2007; Frankel et al., 1998; Yu et al., 2008)(Publication 1, Manuscrit 3), d'autres ont décrit une résistance du transfert du VIH-1 à l'inhibition par les Ac (Chen et al., 2007; Ganesh et al., 2004), suggérant que des structures telles que les synapses virologiques protègeraient le VIH-1 de l'inhibition par les Ac. Aussi, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour définir avec précision l'efficience de l'AcN VRC01, et d'autres Ac spécifiques du VIH-1, dans l'inhibition du transfert du VIH-1, par exemple en utilisant des concentrations plus élevées d'Ac qui pourraient permettre de déterminer si une inhibition totale du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 est possible ou si une partie de ce transfert est réfractaire à l'inhibition par les Ac.

Par ailleurs, l'infection des pDC par le VIH-1 après 2 heures d'incubation avec le virus a été en partie inhibée par l'AcN VRC01 et de façon similaire avec 2 ou 20 µg/mL (environ 20 à 25 % d'inhibition par rapport au contrôle). Cette inhibition a également été retrouvée en présence d'IDV indiquant que VRC01 agirait sur l'infection issue de l'inoculum viral. Cependant, ces résultats ne permettent pas de définir le mécanisme d'inhibition mis en jeu. En effet, cette inhibition pourrait être due à la seule présence de l'Ac, ou au contraire, à un effet dépendant de la fixation de cet Ac sur le VIH-1. En effet, dans le transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4, l'inhibition de l'infection des MoDC a été corrélée avec la maturation (expression du CD83) à la surface de ces cellules (Manuscrit 3). Bien que nous n'observions pas de différence de maturation des pDC en présence et en absence de VRC01, des expériences complémentaires utilisant un anticorps non spécifique du VIH-1 devraient permettre de déterminer si cette inhibition est dépendante de la fixation de l'Ac au VIH-1. A l'opposé, si les deux concentrations de VRC01 ont eu le même effet inhibiteur sur les VIH-1-pDC, un effet dépendant de la concentration de l'Ac ne peut être exclut, et des expériences utilisant des concentrations plus faible d'Ac

devraient être réalisée pour rechercher une réversion de cette inhibition. De manière générale, la caractérisation du mécanisme d'inhibition de l'infection des pDC pré-incubées avec le VIH-1 par les Ac pourra être recherchée en absence et en présence de lymphocytes T afin de déterminer si ces cellules participent à cette inhibition.

Toutefois, sans avoir encore déterminé le mécanisme d'inhibition de l'infection des VIH-1-pDC par les Ac, nous constatons une inhibition similaire de cette infection par deux concentrations différentes de VRC01 alors que l'inhibition du transfert du VIH-1 aux lymphocytes T CD4 a été dépendante de la concentration de VRC01 utilisée. En partant de l'hypothèse que l'inhibition de l'infection des VIH-1-pDC est dépendante de la fixation de VRC01 au VIH-1, ces résultats suggèrent que le virus transféré des VIH-1-pDC aux lymphocytes T CD4 n'est, en majeure partie, pas issu du virus accessible et sensible à l'inhibition présent sur les pDC. Ainsi, le virus à l'origine du transfert pourrait être du virus internalisé au cours des 2 heures d'incubation puis réexposé à la surface des pDC et transféré aux lymphocytes T CD4.

Nous avons analysé la production d'IFN-α dans la co-culture. La cytokine n'a pas été détecté dans les conditions sans VIH, ni dans les conditions où les lymphocytes T CD4 ont été incubés seuls avec le VIH-1 libre. Nous avons observé une production accrue d'IFN-α lorsque les VIH-1-pDC étaient en co-culture avec les lymphocytes T CD4 comparé aux VIH-1-pDC seules. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'origine de cette augmentation de la production d'IFN-α. En effet, lors de l'inhibition du transfert du VIH-1 aux lymphocytes T CD4 par VRC01, nous n'observons pas de différence dans la production de la cytokine comparé au transfert en absence d'Ac, indiquant que la production *de novo* de particules virales par les lymphocytes T CD4 n'a pas d'effet sur cette production. Des phénomènes d'activation des pDC en présence de lymphocytes T CD4 stimulés à la PHA pourraient renforcer la production d'IFN-α par ces cellules, c'est pourquoi la production d'IFN-α dans la co-culture pourrait être analysée en présence de lymphocytes T CD4 non-stimulés à la PHA ou en utilisant le système trans-well afin de déterminer si le contact ou l'état d'activation des lymphocytes jouent un rôle dans cette augmentation.

Par ailleurs, nous n'avons pas recherché l'activité de l'IFN-α dans la co-culture. En effet, nous observons l'infection des lymphocytes T CD4 au cours de plus d'un cycle de réplication du VIH-1, mais la production d'IFN-α détectée pourrait tout de même limiter en partie la réplication du VIH-1. Des expériences visant à bloquer les récepteurs de l'IFN-α à la surface des cellules permettraient d'évaluer la participation de cette cytokine dans l'infection des cellules de la co-culture. De plus, d'autres cytokines et chimiokines pourraient être recherchées dans ces surnageants, notamment MIP-1α et MIP-1β qui sont capables à la fois de recruter les cellules par chimiotactisme et d'inhiber l'infection des cellules par le VIH-1 en se fixant à son co-récepteur

(Piacentini et al., 2009). Dans ces conditions, bloquer le récepteur de ces chimiokines (CCR5) ne serait pas efficace puisque cela empêcherait le virus d'infecter ces cellules cibles. Dans ce cas, utiliser des anticorps dirigés contre les chimiokines elles-mêmes constituerait une solution plus pertinente pour évaluer le rôle de ces molécules. Une alternative à cette solution serait d'utiliser du VIH-1 de tropisme X4 qui n'utilise pas le CCR5 pour infecter les cellules et par conséquent permet de s'affranchir de l'effet inhibiteur de ces chimiokines.

En résumé, nous avons montré que le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 est un transfert en *trans* sensible à l'inhibition par l'anticorps VRC01 spécifique du VIH-1. Ce travail nécessite, selon nous, de procéder à des expériences supplémentaires :

- Analyser l'inhibition du transfert du VIH-1 aux lymphocytes T CD4 avec VRC01 et d'autres anticorps spécifiques ou non du VIH-1 et à des concentrations variées.
- Analyser l'inhibition de l'infection des pDC par le VIH-1 par l'ajout post-exposition d'anticorps spécifique ou non du VIH-1 et à des concentrations variées. Cette étude viserait également à déterminer le temps d'incubation maximal après lequel les anticorps n'auraient plus d'effet.
- Analyser l'effet des cytokines et chimiokines produites sur l'infection des cellules lors du transfert du VIH-1, ainsi que les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la production d'IFN-α (et éventuellement des autres molécules) dans la co-culture.

# Publication 1

# Stimulation de la réplication du VIH-1 dans les cellules dendritiques immatures en contact avec des lymphocytes primaires T-CD4 ou B.

Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4-T or B lymphocytes.

Vincent Holl, Xu Ke, Maryse Peressin, Alexandre Lederle, Maryse Delaporte, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Anne-Marie Aubertin and Christiane Moog.

*Journal of Virology, 2010.*

Les cellules dendritiques présentes à la muqueuse comptent parmi les premières cibles du VIH-1 et participent à la transmission du virus. Après avoir démontré l'efficacité des anticorps neutralisants sur l'infection des MDDC dans les tests de neutralisations, cette étude propose de s'intéresser à l'activité inhibitrice de tels anticorps sur le transfert du VIH-1 des MDDC aux lymphocytes T CD4.

Dans les conditions de transfert, le pourcentage de MDDC infectées a augmenté en présence de lymphocytes T CD4 ou B primaires, et non lors de co-culture avec des lignées permissives au VIH. Cette augmentation s'est révélée être dépendante des contacts entre cellules dendritiques et lymphocytes T CD4 primaires. Le transfert du VIH-1 des MDDC aux lymphocytes T CD4 a été inhibé par l'anticorps neutralisant b12, en dépit de l'augmentation du pourcentage d'infection des MDDC. Néanmoins, cet anticorps neutralisant n'est pas parvenu à inhiber l'infection des MDDC.

Cette étude suggère que le transfert du VIH-1 des MDDC aux lymphocytes T CD4 peut être efficacement inhibé par les anticorps neutralisants, même si le VIH-1 exploite ces contacts entre cellules afin de faciliter sa réplication et sa transmission.

JOURNAL OF VIROLOGY, May 2010, p. 4172–4182 Vol. 84, No. 9
0022-538X/10/$12.00 doi:10.1128/JVI.01567-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

# Stimulation of HIV-1 Replication in Immature Dendritic Cells in Contact with Primary CD4 T or B Lymphocytes▽

Vincent Holl,* Ke Xu, Maryse Peressin, Alexandre Lederle, Marina Elizabeth Biedma, Maryse Delaporte, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Géraldine Laumond, Anne-Marie Aubertin, and Christiane Moog

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médical (INSERM), Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg (UdS), 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France*

Received 29 July 2009/Accepted 3 February 2010

**Sexual transmission is the major route of HIV-1 infection worldwide. Dendritic cells (DCs) from the mucosal layers are considered to be the initial targets of HIV-1 and probably play a crucial role in HIV-1 transmission. We investigated the role of cell-to-cell contact between HIV-1-exposed immature DCs and various lymphocyte subsets in the stimulation of HIV-1 replication. We found that HIV-1 replication and production in DCs were substantially enhanced by the coculture of DCs with primary CD4 T or nonpermissive B lymphocytes but not with primary activated CD8 T lymphocytes or human transformed CD4 T lymphocytes. Most of the new virions released by cocultures of HIV-1-exposed immature DCs and primary B lymphocytes expressed the DC-specific marker CD1a and were infectious for both immature DCs and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Cocultured DCs thus produced large numbers of infectious viral particles under these experimental conditions. The soluble factors present in the supernatants of the cocultures were not sufficient to enhance HIV-1 replication in DCs, for which cell-to-cell contact was required. The neutralizing monoclonal antibody IgG1b12 and polyclonal anti-HIV-1 sera efficiently blocked HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes but did not prevent the increase in viral replication in DCs. Neutralizing antibodies thus proved to be more efficient at blocking HIV-1 transfer than previously thought. Our findings show that HIV-1 exploits DC-lymphocyte cross talk to upregulate replication within the DC reservoir. We provide evidence for a novel mechanism that may facilitate HIV-1 replication and transmission. This mechanism may favor HIV-1 pathogenesis, immune evasion, and persistence.**

Most infectious agents of sexually transmitted diseases, including HIV-1, initiate infection via the mucosal epithelial surfaces of the genital tract. Immature dendritic cells (DCs) in the underlying mucosa are among the first antigen-presenting cells (APCs) encountered by HIV-1 after sexual transmission (7, 19, 22, 28, 53, 60, 61). These specialized APCs efficiently capture viruses through their specific uptake receptors for the processing and presentation of viral antigens to T or B lymphocytes (4). They establish stable or transient cell-to-cell contacts with various naive or memory T or B lymphocytes to generate and orchestrate adaptive virus-specific immune responses. HIV-1 replication in DCs, both *in vivo* and *in vitro*, has been firmly demonstrated, although HIV-1 infection of DCs *in vitro* is less efficient than the infection of primary CD4 T lymphocytes. The mechanisms responsible for the limited replication of HIV-1 in DCs have not been elucidated, but it has been suggested that intracellular restriction factors present in these cells, such as members of the APOBEC family or other, as yet unknown restriction factors, may interfere with the early steps of HIV-1 infection (15, 41, 54). The low availability of active transcription factors, such as NF-κB, in immature DCs is also known to limit HIV-1 replication. HIV-1 replication in DCs is poor, but many studies have reported the efficient transmission of infectious HIV-1 particles in *trans* from DCs to nearby permissive CD4 T lymphocytes, via several different pathways (7, 8, 18, 33, 36, 52, 57, 59, 60, 62). HIV-1 transfer from DCs to CD4 target cells probably increases the efficiency of HIV-1 *trans*-infection of CD4 T lymphocytes. It has been suggested that naive or memory CD4 T lymphocytes interacting with HIV-1-infected DCs form an immunological synapse (IS) mediating a T-cell activation program, leading to transmission of the virus from DCs to activated CD4 T lymphocytes, in which it replicates. This process of HIV-1 transmission has been proposed as an effective mode of cell-to-cell propagation of the initial infection and of latent infection generation in HIV-specific memory CD4 T lymphocytes. It has also been suggested that the mode of HIV-1 transfer from DCs to CD4 T target cells through an infectious synapse is resistant to antibody neutralization. However, conflicting data concerning the role of neutralizing antibodies in the HIV-1 *trans*-infection of CD4 T target cells have been reported (7–9, 13, 14).

An understanding of the way in which HIV-1 interacts with and replicates in the various types of primary target cells in the mucosal layers is essential for the design of therapeutic agents for preventing the early steps of HIV-1 infection at these sites of entry. Several studies have focused on the amplification of HIV-1 replication in primary CD4 T lymphocytes or human CD4 T-cell lines in the presence of mature DCs, but to our knowledge, the ability of HIV-1 to replicate in immature DCs

* Corresponding author. Mailing address: Institut National de la Santé et de la Recherche Médical (INSERM), Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg (UdS), 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France. Phone: 33 3 90 24 37 10. Fax: 33 3 90 24 37 23. E-mail: hollv@unistra.fr.

▽ Published ahead of print on 10 February 2010.

during cell-to-cell interactions with primary T- or B-lymphocyte subsets has yet to be investigated. The development of a future HIV-1 vaccine candidate inducing protective mucosal immunity will depend on elucidation of the early events of HIV-1 replication in infected immature DCs interacting with various lymphocyte subsets. It will also be important to determine whether HIV-1-neutralizing antibodies can inhibit HIV-1 transfer from immature DCs to primary activated CD4 T lymphocytes.

We provide several lines of evidence that HIV-1 replication is efficiently stimulated in DCs during cross talk with primary CD4 T or B lymphocytes. We found that this enhancement of HIV-1 replication in DCs required early and specific cell-to-cell interaction between infected DCs and primary lymphocytes. We also showed that neutralizing polyclonal and monoclonal IgGs robustly inhibited productive HIV-1 *trans*-infection of primary CD4 T lymphocytes cocultured with infected DCs.

## MATERIALS AND METHODS

**Ethics statement.** Large volumes of sera from HIV-1-infected individuals and healthy HIV-1-seronegative donors were obtained by apheresis with the approval of the appropriate institutional review board (the Comité Consultatif pour la Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale [CCPPRB]).

**Cell preparation.** Immature monocyte-derived DCs (MoDCs) were generated by inducing the differentiation of human monocytes as described previously (21). Briefly, monocytes were isolated from human peripheral blood leukocytes from healthy HIV-1-seronegative donors by the selection of CD14-positive cells by isolation on magnetic beads (AutoMacs; Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) and cultured for 6 days in RPMI 1640 with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) in the presence of 20 ng/ml interleukin-4 (IL-4) and 10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; both from R&D Systems, Minneapolis, MN). After the monocytes had been collected, residual CD19 B lymphocytes and CD4 and CD8 T lymphocytes were successively purified (up to 98% purity) by positive selection. Langerhans cells (LCs) were isolated from purified human cord blood CD34 progenitor cells by one-step immunomagnetic positive selection with materials from Miltenyi Biotec after Ficoll-Hypaque sedimentation. Purified CD34 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, penicillin (100 μg/ml), streptomycin (100 μg/ml), 50 ng/ml Flt3 ligand, 50 ng/ml GM-CSF, 25 ng/ml stem cell factor (SCF), and 10 ng/ml thrombopoietin (TPO; all from R&D Systems) for 7 days at 37°C under an atmosphere containing 5% $CO_2$ to allow multiplication. The differentiation of these cells into LCs and interstitial DCs (intDCs) was then triggered by incubation with a mixture of 50 ng/ml GM-CSF, 6 ng/ml transforming growth factor β1 (TGF-β1), and 2 ng/ml tumor necrosis factor alpha (TNF-α) for a further 7 days. Autologous CD4 T lymphocytes from human cord blood samples were purified by positive selection after the collection of CD34 stem cells. For some experiments, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or purified lymphocytes were frozen in liquid nitrogen until use (they were thawed for 18 h before addition to infected DCs). Human CD4 T-lymphocyte cell lines (Jurkat, MT4, CEMSS, and MT2 high CCR5) were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS with penicillin (100 μg/ml) and streptomycin (100 μg/ml).

**Virus preparation.** R5 HIV-1 primary isolates were produced in human blood leukocytes as described previously (6). Virus stocks were collected at peak virus production and were concentrated by a factor of 80 with a 100-kDa-cutoff polyethersulfone filter (Centricon 80 Plus Biomax filter; Millipore, Molsheim, France). HIV-$1_{Bx08}$ was provided by H. Fleury, and the HIV-$1_{BaL}$ isolates (subtype B R5 strains) were provided by S. Gartner, M. Popovic, and R. Gallo from the National Institutes of Health. HIV-$1_{CN54}$ and HIV-$1_{TV-1}$ were obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) and S. Engelbrecht, respectively. Before their addition to cultures of immature DCs, concentrated viruses were purified by gel filtration with a Sephadex exclusion column used to remove fetal calf serum (FCS) proteins and free gp120 as described previously (6, 35). HIV-1 pseudo-virus-like particles (pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-$env_{SF162}$, backbone vector pSG3ΔEnv, and a vpr-green fluorescent protein [GFP] plasmid) were prepared as described previously (32).

**Coculture of HIV-1-infected DCs with lymphocytes.** MoDCs were infected and cocultured with various types of primary lymphocytes under conditions similar to those described previously for HIV-1 transfer experiments (8, 18, 36, 59, 62). Briefly, immature MoDCs were infected with primary R5 HIV-1 isolates (500 ng/ml viral p24 antigen) by being incubated with the virus for 2 h. MoDCs were then washed thoroughly to remove unbound virus and resuspended at a density of $8 \times 10^6$ cells per ml in RPMI 1640 containing 5% FCS and supplemented with GM-CSF and IL-4. Aliquots (25 μl) of HIV-1-exposed immature MoDCs were added to 25 μl of a cell suspension containing $8 \times 10^5$ autologous or allogeneic phytohemagglutinin (PHA)-activated or nonactivated T or B lymphocytes, thawed 1 day before the infection of MoDCs with HIV-1, or $4 \times 10^5$ human CD4 T-cell lines in a flat-bottomed 96-well plate. In parallel, HIV-1-exposed MoDCs were cultured alone. Unless otherwise stated, we assessed productive infection after 48 h of culture by using flow cytometry to detect intracellular viral p24 antigen (21, 56). Virus release into the supernatant was assessed in the p24 viral antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with an Innotest assay kit (Innogenetics, Ghent, Belgium).

**Microscopy.** Immature MoDCs were exposed to HIV-1 pSG3$Env_{SF162}$ vpr-GFP pseudoparticles (32) for 2 h and then washed and stained with Alexa Fluor 647-conjugated anti-human DC-SIGN monoclonal antibody (BD Biosciences [BD]). Labeled cells were washed, fixed with BD Cytofix solution, and transferred out of the biosafety level 3 (BSL3) laboratory. After cytospin centrifugation at 200 rpm for 5 min, MoDCs were covered with Aqua-Poly/Mount solution (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) and incubated under coverslips overnight at room temperature in the dark. Stained MoDCs were viewed with an Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss Vision International GmbH, Oberkochen, Germany), and images were analyzed with Imaris software (Bitplane, Saint Paul, MN) after deconvolution with AutoDeblur software (AutoQuant X; Media Cybernetics, Bethesda, MD).

**Fluorescence-activated cell sorter analysis.** Mouse monoclonal antibodies against human CD11b, DC-SIGN, CD1a, and CD3 were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA); mouse anti-HIV-1 p24 monoclonal antibody (clone KC57) and monoclonal antibody against human CD207 (langerin) were obtained from Coulter Beckman (Fullerton, CA). Cells were labeled with antibodies directed against human cell surface molecules, washed, fixed, and permeabilized in Cytofix and Perm/Wash kit solutions (used according to the manufacturer's instructions). Cells were then stained for intracellular viral p24, washed again, and analyzed by flow cytometry. Multicolor data were acquired with a cytometer (LSRII SORP; BD Biosciences, San Jose, CA), as recommended elsewhere (39). Cytometer setup and tracking (CST) calibration particles (BD) were used to ensure the consistency of fluorescence intensity measurements throughout all experiments. Compensation was achieved with a flow cytometry CompBeads kit (BD). Gating on forward and side light scatter was used to exclude dead cells and debris from the analysis. Forward width and forward area were used to exclude doublet cells. The final analysis was performed and the graphical output was generated with FACSDiva software (BD).

**Real-time RT-PCR.** Total RNA from cells subjected to various treatments was extracted with Trizol reagent used according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen), and the RNA samples were treated with DNase I (Qiagen). TaqMan quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR analysis was performed with reagents from Applied Biosystems used according to the manufacturer's instructions in an iCycler iQ real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Primers, the TaqMan probe long terminal repeat (LTR), and the external standard were used as described previously (46).

**Transwell cell culture insert experiments.** Millicell-24 cell culture assembly insert plates with a pore size of 0.4 μm (Millipore, Bedford, MA) were used to prevent cell-to-cell contact. The outer wells contained HIV-1-exposed MoDCs, and the inner wells contained primary lymphocyte subsets. In a control plate, CD4 T lymphocytes were cultured in the inner wells together with uninfected or HIV-$1_{BaL}$-infected MoDCs whereas the outer wells contained medium alone. In all cases, the final volume of medium was 250 μl, and triplicates were set up for each condition. Cells were harvested on days 2 and 5 (data not shown) for surface CD3, DC-SIGN, and intracellular p24 antigen staining analyses, followed by flow cytometry.

**Characterization of the virus particles released.** Virus-containing culture supernatants were centrifuged to remove cellular debris before analysis for the presence of host cell-derived surface molecules incorporated into the envelope during budding. This analysis involved the capture of viral particles with magnetic microbeads coupled to specific antibodies directed against markers of different cell types (59). Briefly, cleared cell-free supernatants were incubated with magnetic beads coated with mouse anti-human CD1a or CD3 antibodies (Miltenyi Biotec) at a 1:2 bead-to-supernatant volume ratio for 15 min at 4°C. Magnetic bead-bound fractions were separated from the supernatant by selective

retention on equilibrated μMACS magnetic columns (Miltenyi Biotec). Columns were washed four times with MACS running buffer (1× phosphate-buffered saline, 0.5% bovine serum albumin [BSA], and 2 mM EDTA), and the retained fractions were eluted with MACS rinse buffer (MACS running buffer without BSA). We determined the number of HIV-1 particles in each fraction bearing a given cell antigen by p24 ELISA. Supernatants from cell cultures maintained in the presence of azidothymidine (AZT), an inhibitor of HIV-1 replication, were used to determine p24 background levels (i.e., those from residual input virus particles or free or HIV-1-associated exosomes released from MoDCs). We evaluated the infectivity of viral particles produced under various MoDC-lymphocyte coculture conditions by measurement of the 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$).

**Virus infectivity.** The capacities of viruses to infect PBMCs or immature MoDCs and to produce new viral particles were determined as reported previously (6). Cells were infected with serial dilutions of cell-free virus supernatant from HIV-1-exposed immature MoDCs cultured for 5 days alone or together with activated CD4 T lymphocytes or nonactivated B lymphocytes. After 4 days of infection, cells were washed twice and cultured for an additional 7 days in fresh culture medium. Virus-producing cultures were identified by subjecting culture supernatants to p24 ELISA. The $TCID_{50}$ was calculated by the Reed-Muench method.

**Neutralizing monoclonal antibodies.** The monoclonal neutralizing antibody IgG1b12, directed against the CD4 binding site of gp120, was a gift from Dennis Burton (Scripps, La Jolla, CA). Polyclonal neutralizing and non-HIV-1 IgG antibodies were purified from the sera of asymptomatic HIV-1-positive individuals and seronegative healthy blood donors, respectively (6, 21).

**Inhibition of HIV transfer from immature DCs to T lymphocytes.** HIV-1 *trans*-infection of CD4 T lymphocytes was inhibited with antibodies as described previously (24). Briefly, immature MoDCs were loaded with HIV-1 for 2 h and then washed. Neutralizing antibodies were then added to the cells, together with autologous primary activated CD4 T lymphocytes. After 48 h, the inhibitory effect of neutralizing antibodies was determined by comparing the percentages of the two cell types positively stained for intracellular p24 antigen in the presence and absence of neutralizing antibodies.

**Statistical analysis.** A nonparametric two-tailed Mann-Whitney U test was used to assess differences among groups. Values of $P$ of $<0.05$ were considered to be statistically significant for the two-tailed Mann-Whitney U test, and values of $P$ of $<0.017$ were considered to be statistically significant for the two-tailed Mann-Whitney U test with Bonferroni's correction. Statistical calculations were performed using R software (Department of Statistics and Mathematics, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## RESULTS

**HIV-1 replication and production in immature MoDCs, LCs, and intDCs are strongly enhanced in the presence of primary human CD4 T lymphocytes.** DCs infected *in vivo* at mucosal sites may be a source of viral particles for other responding CD4 target cells, but little is known about their HIV-1 replication capacity during cross talk with various lymphocyte populations. We studied the effect of DC-lymphocyte interactions on HIV-1 replication in DCs by incubating immature MoDCs or CD34-derived LCs and intDCs with R5 HIV-1 primary isolates for 2 h before adding purified primary blood lymphocytes or human transformed CD4 T lymphocytes.

We used flow cytometry to detect intracellular p24 viral antigen—a reliable early indicator of productive infection (56)—and cell-specific markers for the phenotypic characterization of infected cells. Immature DC-SIGN-positive (DC-SIGN$^+$) MoDCs exposed to HIV-1 for 2 h efficiently captured viral particles, as shown by fluorescence microscopy (Fig. 1A), but only a few MoDCs were able to replicate HIV-1 (0.02% of DC-SIGN$^+$ MoDCs were p24 positive) (Fig. 1B, first column). However, in the presence of autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes, the HIV-1 infection of immature MoDCs was markedly enhanced, as shown by intracellular p24 antigen levels (2.61% of DC-SIGN$^+$ MoDCs were p24 positive) (Fig. 1B, second column). Indeed, viral p24 antigen was detectable in MoDCs by 24 h (Fig. 1C). At 48 h, the percentage of infected MoDCs in the coculture was markedly higher than the percentage of infected MoDCs among HIV-1-exposed MoDCs cultured alone (Fig. 1C). The percentage of infected MoDCs in the coculture continued to increase from the 48-h time point to day 3 (Fig. 1C) and day 5 (data not shown). HIV-1 replication in PHA-activated CD4 T lymphocytes in the coculture was also observed (Fig. 1B, bottom row, and D), confirming previous observations that infected DCs can efficiently transmit infectious viral particles (8, 18, 33, 36, 52, 57). As a control, AZT, a reverse transcriptase inhibitor, was added 2 h after the infection of MoDCs, at the same time that CD4 T lymphocytes were added. AZT prevented HIV-1 replication in both MoDCs and CD4 T lymphocytes, indicating that the viral p24 antigen detected in the absence of AZT resulted from *de novo* synthesis (Fig. 1B). The relationship between virus input and the percentage of p24-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs was also investigated. In experiments with serial dilutions of virus inoculum, a dose-dependent response curve was obtained when the amount of virus loaded and the percentage of infected MoDCs after 2 days of coculture with CD4 T lymphocytes were plotted (Fig. 1E). Thus, a plateau was not reached with this virus input (500 ng/ml viral p24 antigen used in our experiments). The number of virions released, assessed by determining extracellular p24 antigen levels, was greater in the MoDC-T-lymphocyte coculture than in cultures of HIV-1-exposed MoDCs alone (Fig. 1F). Furthermore, the quantification of viral mRNA in the cells demonstrated viral transcription levels to be higher in cocultured cells, regardless of the activation status of the primary CD4 T lymphocytes (Fig. 1G). The increase in viral p24 production in MoDCs did not require HIV-1 multiplication in CD4 T lymphocytes, as this effect was also observed in the presence of nonactivated CD4 T lymphocytes unable to support viral replication (Fig. 1B and C). The increase in viral replication in intracellular p24-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs was actually greater in the presence of nonactivated CD4 T lymphocytes than in the presence of activated ones. The exposure of immature MoDCs to a panel of different R5 HIV-1 clade B primary isolates led to similar increases in HIV-1 replication in MoDCs (Fig. 1H). The percentages of CD34-derived LCs and intDCs infected with clade B R5 HIV-$1_{BaL}$ isolates (Fig. 1I) and clade C R5 HIV-$1_{TV-1}$ isolates (data not shown) were also higher in the presence of autologous primary CD4 T lymphocytes than in the absence of such cells. This phenomenon, therefore, occurs with various R5 isolates and DC subsets and is not restricted to DC-SIGN$^+$ MoDCs. In contrast, we detected no stimulation of HIV-1 production in monocyte-derived macrophages cocultured with autologous nonactivated primary CD4 T lymphocytes (data not shown), demonstrating that the stimulatory process is specific to DCs. Our findings indicate that coculture of DCs and CD4 T lymphocytes promotes efficient HIV-1 replication in immature DCs, even if the primary CD4 T lymphocytes are not infected.

**Stimulation of HIV-1 replication in MoDCs is also detected in the presence of primary B lymphocytes but not in the presence of PHA-activated CD8 T lymphocytes or human transformed CD4 T cells.** CD4 T lymphocytes were not the only leukocyte population able to increase the proportion of MoDCs producing viral p24 antigen. A similar effect was ob-

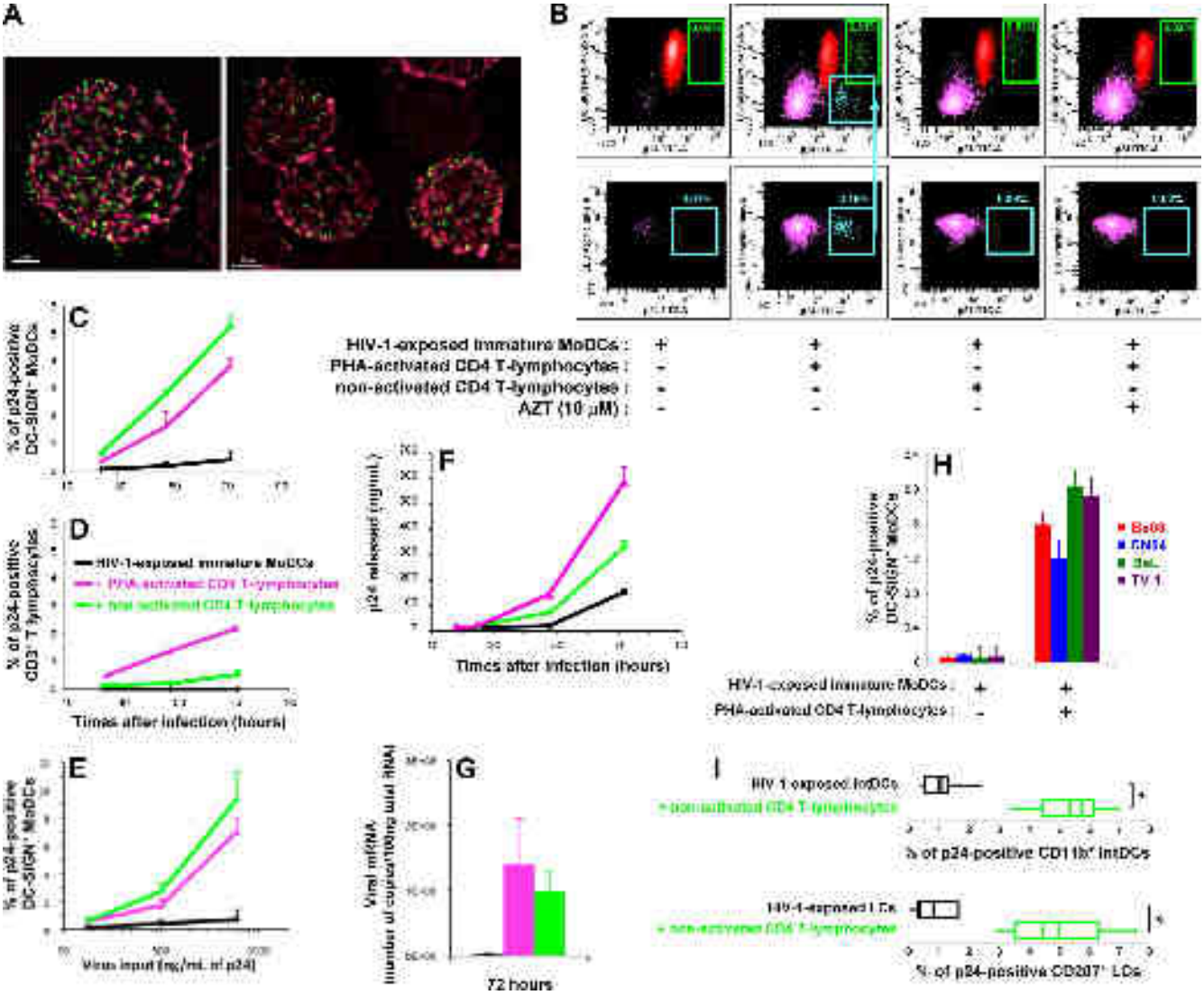



FIG. 1. Increase in HIV-1 p24 antigen production in immature MoDCs in the presence of cocultured primary CD4 T lymphocytes. (A) Immunofluorescence analysis of the binding of HIV-1 pSG3Env$_{SF162}$ vpr-GFP pseudoparticles (green) to immature MoDCs 2 h postinfection. Membranes were stained with anti-human DC-SIGN IgG (red). Bars, 3 μm (left) and 10 μm (right). (B) Dot plots of intracellular p24-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs (green) and CD3$^+$ CD4 T lymphocytes (purple) after 48 h of culture. The teal arrowhead indicates the percentage of infected CD4 T lymphocytes in the CD3-positive gate. PerCP Cy5.5; peridinin-chlorophyll cyanine 5.5; FITC, fluorescein isothiocyanate. (C and D) Immature MoDCs were exposed to HIV-1$_{BaL}$ for 2 h before the addition of uninfected autologous PHA-activated or nonactivated CD4 T lymphocytes. Percentages of MoDCs (C) and CD4 T lymphocytes (D) producing intracellular p24 antigen were determined by flow cytometry. Data are the means ± standard deviations (SD) of triplicate results. (E) Dose-dependent response curve obtained by plotting the amount of input virus loaded into immature DCs against the percentage of p24-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs detected after 48 h of coculture with autologous CD4 T lymphocytes. Data are the means ± SD of triplicate results. Data from one representative experiment of four are shown. (F) Cell-free supernatants were collected after various amounts of time, and extracellular viral p24 antigen levels were determined by ELISA. Data are the means ± SD of triplicate results. (G) Quantification of viral mRNA in cocultures of HIV-1-exposed MoDCs and activated or nonactivated CD4 T lymphocytes ($n$ = 3) by RT-PCR. (H) Immature MoDCs were infected with various R5 HIV-1 primary isolates and cultured with or without activated CD4 T lymphocytes for 48 h ($n$ = 3). (I) Box plot analyses of intracellular viral p24 antigen in cocultures ($n$ = 5) of HIV-exposed LCs or intDCs and uninfected autologous nonactivated CD4 T lymphocytes after 3 days. Data are the means ± standard errors of the means (SEM) of results from $n$ independent experiments. A two-tailed Mann-Whitney U test with Bonferroni's correction was used to assess differences between groups. A value of $P$ of <0.025 was considered significant. *, $P < 0.025$ versus the control group.

served following the addition of peripheral blood lymphocytes (PBLs) depleted of CD4 target cells (Fig. 2A). Indeed, the presence of purified primary B lymphocytes in the coculture strongly stimulated HIV-1 replication in MoDCs. In contrast, the addition of PHA-activated CD8 T lymphocytes to infected MoDCs had no significant effect on the percentage of p24-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs (Fig. 2A). In parallel, we determined the levels of viral mRNA in these various cocultures by real-time RT-PCR. The number of HIV-1 mRNA copies in the coculture of HIV-1-exposed MoDCs and primary B lymphocytes was 70 times higher than that in the culture of infected MoDCs alone. In contrast, the quantity of HIV mRNA in the

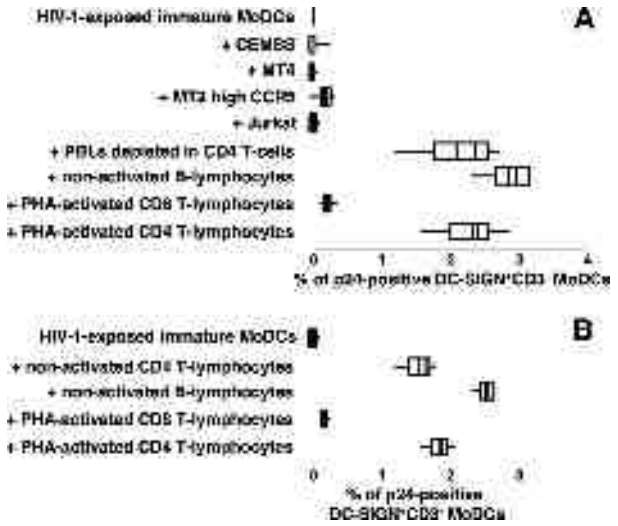



FIG. 2. Stimulation of HIV-1 replication in infected MoDCs cocultured with primary B lymphocytes but not with human CD4 T-cell lines. (A) Box plot analysis of the percentage of p24-positive DC-SIGN$^+$ CD3$^-$ MoDCs following the coculture of HIV-1-exposed MoDCs and autologous CD4 T lymphocyte-depleted PBLs ($n = 4$), nonactivated B lymphocytes ($n = 5$), PHA-activated CD8 T lymphocytes ($n = 7$), PHA-activated CD4 T lymphocytes ($n = 10$), or various human CD4 T-cell lines ($n = 4$) for 48 h. (B) Box plot analysis of the percentage of infected DC-SIGN$^+$ CD3$^-$ MoDCs in the presence of allogeneic T- or B-lymphocyte populations ($n = 3$) after 48 h of coculture. Data are the means ± SEM of results from $n$ independent experiments.

coculture with activated CD8 T lymphocytes was not significantly different from that in the culture of infected MoDCs alone. The lack of increase in the number of HIV-1-infected MoDCs and in viral mRNA in the coculture with PHA-activated CD8 T lymphocytes may be due to the apoptosis of HIV-infected MoDCs induced by these activated T lymphocytes. Indeed, we observed an increase, by a factor of five, in the number of hypodiploid DNA particles in MoDCs (data not shown). Transformed human CD4 T lymphocytes, which are commonly used as HIV-1 target cells in studies of HIV-1 transfer, had no significant effect on the rate of MoDC infection (Fig. 2A). In contrast, coculture with allogeneic primary CD4 T or B lymphocytes at a DC/lymphocyte ratio of 1:4 resulted in an increase in HIV-1 replication in MoDCs. Thus, autologous or allogeneic primary lymphocytes stimulate HIV-1 replication in MoDCs (Fig. 2B).

**The infectious virions released in coculture are produced by infected MoDCs.** We investigated the cellular origin of the virions released into the supernatant of the coculture. We checked for host cell-derived molecules (37, 59), such as CD1a and CD3, which are incorporated at the surfaces of virus particles budding from MoDCs and CD4 T lymphocytes, respectively. The input virus produced in PBLs expressed mostly the CD3 marker (Fig. 3A), whereas a significant proportion of virus particles released in the DC-CD4 T-lymphocyte coculture carried the DC-specific markers CD1a (Fig. 3B) and CD11b (data not shown). In addition, the virions produced in the MoDC-B-lymphocyte coculture were mostly CD1a positive (i.e., produced by DCs). The number of CD1a-positive virus particles increased with the time of infection (Fig. 3B). Moreover, the resulting virus suspensions were infectious, as they productively infected MoDCs and PBMCs (Fig. 3C). No virus particles were detected in the supernatants of cocultures containing AZT (Fig. 3B) or cocultures of HIV-1-exposed MoDCs and PHA-activated CD8 T lymphocytes (data not shown). Thus, MoDCs efficiently produced infectious HIV-1 particles

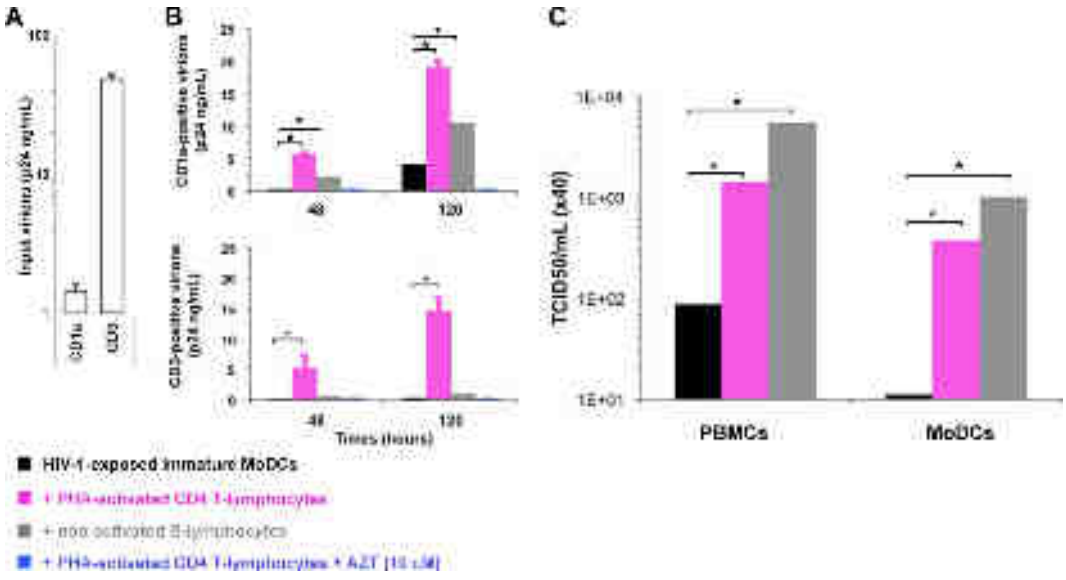



FIG. 3. The infectious HIV-1 particles released into the supernatant of the coculture are produced principally by infected MoDCs. (A and B) Virus particles positive for CD1a or CD3 were subjected to immunomagnetic separation and quantification by p24 ELISA ($n = 4$). Levels of these host cell surface markers detected on the envelopes of virions from input virus (A) or cell-free supernatants from cocultures (B) are shown. (B) Amounts of CD1a (top)- or CD3 (bottom)-positive virus particles collected after 2 and 5 days of culture ($n = 4$). The values plotted on all graphs are the means ± SEM of results from $n$ independent experiments. (C) Infectivities ($TCID_{50}$s) of the cell-free virus supernatants for PBMCs and immature MoDCs. Two-tailed Mann-Whitney U tests with Bonferroni's correction were used to assess differences between groups. A value of $P$ of <0.017 was considered statistically significant. *, $P < 0.017$ versus controls.

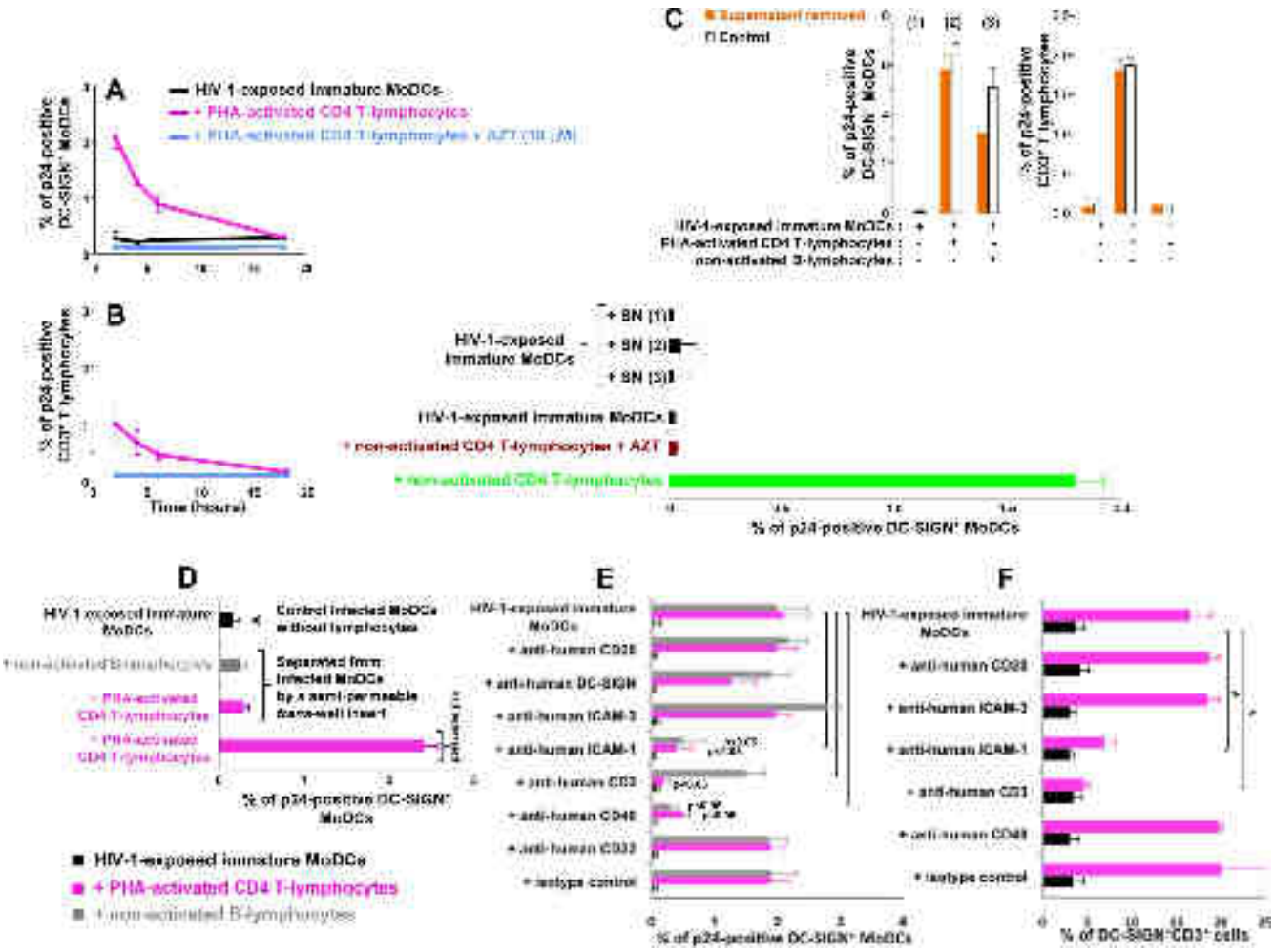



FIG. 4. Early cell-to-cell contact is required for the increase in HIV-1 replication in infected DCs. (A and B) CD4 T lymphocytes were added at various time points after the infection of immature MoDCs. The percentage of DC-SIGN$^+$ DCs (A) or CD3$^+$ CD4 T lymphocytes (B) expressing p24 was determined after 48 h. (C) Supernatants (SN) from HIV-1-exposed MoDCs, cultured alone [SN (1)] or cocultured with CD4 T lymphocytes [SN (2)] or B lymphocytes [SN (3)], were collected at 6 h and added to infected immature MoDCs. (Bottom) After 48 h, intracellular p24 levels were determined. (Top) In parallel, we used flow cytometry to measure intracellular p24 production at 48 h in cells from which supernatants (1, 2, and 3) had been removed (orange bars) or not removed (white bars). (D) HIV-1-exposed MoDCs and uninfected lymphocytes were left in contact or separated with a Transwell insert, and intracellular p24 levels were determined after 48 h. (E) PHA-activated CD4 T or B lymphocytes were pulsed with 20 μg/ml mouse monoclonal IgG2a directed against human CD3 (clone OKT3 [azide free]; Miltenyi Biotec) before being added to HIV-1-exposed immature MoDCs. We added 20 μg/ml mouse monoclonal IgG1 directed against CD40 (clone B-B20 [azide free]; Abcam), ICAM-3 (clone B-R1 [azide free]; Abcam), ICAM-1 (clone 1H4 [azide free]; Abcam), CD20 (clone MEM-97 [azide free]; Abcam), DC-SIGN (clone DCN46; BD Pharmingen), CD32 (clone 3D3; BD Pharmingen), or a mouse monoclonal IgG1 isotype (clone NCM1; Abcam) to the coculture at the same time as CD4 T lymphocytes. After 48 h of coculture, intracellular p24 levels were determined by flow cytometry. (F) In parallel, MoDC-CD4 T-cell conjugates were evaluated by determining the percentage of DC-SIGN$^+$ CD3$^+$ cells by flow cytometry. The values plotted on all graphs are means ± SD of triplicate results from a single representative experiment. A value of $P$ of $<0.05$ was considered significant. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control group.

when cocultured with primary CD4 T lymphocytes or nonpermissive B lymphocytes.

**Early cell-to-cell contacts between infected DCs and primary lymphocytes are required for the stimulation of HIV-1 production in MoDCs.** We then added primary lymphocytes to HIV-1-exposed MoDCs at various time points. Kinetic analysis showed that the stimulation of HIV-1 replication in MoDCs was less efficient if the addition of PHA-activated CD4 T lymphocytes to HIV-1-exposed MoDCs was delayed. The percentage of p24-positive MoDCs detected after 2 days (Fig. 4A) or 3 days (data not shown) decreased as a function of time between HIV-1 exposure and the addition of CD4 T lymphocytes, suggesting that the addition of lymphocytes may stimulate an early step of HIV-1 replication in MoDCs. Moreover, when MoDCs were infected for a longer period of time before the addition of primary CD4 T lymphocytes, the percentage of p24-positive CD4 T lymphocytes also decreased (Fig. 4B). Thus, the HIV-1 *trans*-infection of CD4 T lymphocytes was efficient only for a limited period of time after the loading of MoDCs with virus; after this period, HIV-1 transfer in *cis* may occur, as suggested in previous studies (13, 18, 57). Moreover, kinetic analysis after the addition of AZT suggested that the

reverse transcription of viral RNA was more rapid after the addition of lymphocytes (data not shown), consistent with the higher viral mRNA levels in the presence of lymphocytes as detected by RT-PCR (Fig. 1G).

We investigated whether the release of infectious viral particles (e.g., those associated with exosomes) or soluble factors was involved in the stimulation of HIV-1 replication in cocultured MoDCs by removing the supernatants from MoDCs infected in the presence of CD4 T or B lymphocytes after 6 h of coculture and adding them to HIV-1-exposed immature MoDCs. The addition of these supernatants to HIV-1-exposed MoDCs did not result in the stimulation of HIV-1 replication (Fig. 4C, bottom). Moreover, HIV-1 replication in MoDCs in the coculture from which the supernatant was removed was not significantly affected (Fig. 4C, top).

In contrast, when cell-to-cell contact was prevented by a cell culture membrane insert, coculture with CD4 T or B lymphocytes no longer affected MoDCs (Fig. 4D). The increase in HIV-1 replication in cocultured MoDCs was also substantially decreased when PHA-activated CD4 T lymphocytes, but not B lymphocytes, were first pulsed or continuously incubated with 20 μg/ml monoclonal anti-human CD3 antibody (Fig. 4E). Moreover, the addition of 20 μg/ml monoclonal antibody directed against human CD40 receptor or ICAM-1 to HIV-1-exposed immature MoDCs at the same time as PHA-activated CD4 T lymphocytes (Fig. 4E) or nonactivated B and CD4 T lymphocytes (data not shown) significantly inhibited the stimulation of HIV replication in MoDCs. In the presence of anti-human CD40 antibody, the decrease in HIV replication in MoDCs was associated with the induction of DC maturation markers (more than 85% of DC-SIGN$^+$ MoDCs were CD83 positive). This DC maturation may contribute to the decrease in R5 HIV-1 replication in infected MoDCs (as mature MoDCs do not support R5 HIV-1 replication [41]). In contrast, in the presence of anti-human CD3 or ICAM-1 antibody, no DC maturation was recorded (data not shown). In parallel, the percentage of cells positive for both DC-SIGN and CD3 was determined by flow cytometry. Blocking ICAM-1-LFA-1 interaction between MoDCs and activated CD4 T lymphocytes markedly decreased the percentage of DC-SIGN$^+$ CD3$^+$ cells, whereas inhibiting the CD40-CD40L interaction had no significant effect on this percentage (Fig. 4F). The purified mouse monoclonal IgG directed against CD3 masked the CD3 binding site, hindering the detection of cell conjugates by flow cytometry. We were therefore unable to draw any firm conclusions on the inhibition of DC-SIGN$^+$ CD3$^+$ cell conjugate formation by anti-human CD3 antibody under these conditions.

The addition of monoclonal antibody directed against DC-SIGN, CD32, CD20, or ICAM-3 did not significantly affect the percentage of DC-SIGN$^+$ CD3$^+$ cells or the proportion of infected MoDCs in cocultures with activated CD4 T lymphocytes (Fig. 4E and F and data not shown). In addition, no doubly positive cells were detected by flow cytometry when HIV-exposed MoDCs were cocultured with nonactivated B or CD4 T lymphocytes (data not shown), although anti-ICAM-1 and anti-CD40 antibodies inhibit HIV stimulation in MoDCs. Thus, overall, our data demonstrate that efficient HIV-1 replication in MoDCs is dependent on cellular interactions between MoDCs and lymphocytes in primary cultures but not on viral particles or soluble factors released during early cell-to-cell contact.

**Neutralizing IgGs inhibit HIV-1 *trans*-infection.** The greater efficiency of HIV-1 production in immature MoDCs cocultured with primary lymphocytes highlights the need to reconsider the potential inhibitory effects of antibodies on R5 HIV-1 transfer from DCs to CD4 T lymphocytes. Indeed, in previous studies based on a similar *in vitro* experimental design, the neutralizing activities of antibodies were recorded by analyzing virus p24 particles released into the supernatant but the increase in HIV-1 particle release from DCs was not taken into account. In this study, we determined the percentage of infected cells by flow cytometry and found that adding 25 μg/ml of neutralizing monoclonal IgG1b12 antibody (recognizing a conserved epitope overlapping the CD4 binding site of HIV-1 gp120) at the same time as PHA-activated CD4 T lymphocytes to HIV-1-exposed immature MoDCs abolished the HIV-1 infection of the CD4 T lymphocytes (Fig. 5A), despite the absence of a strong inhibitory effect on HIV-1 replication in MoDCs (Fig. 5B). As a consequence, only a limited decrease in p24 levels in the supernatant in the presence of neutralizing IgG1b12 antibodies occurred (Fig. 5C). Thus, IgG1b12, when added 2 h after the infection of immature DCs, efficiently blocked productive HIV-1 transfer from infected MoDCs to activated CD4 T lymphocytes, although this effect was not apparent from determinations of soluble p24 Gag levels in the supernatant. Similarly, CD4 T lymphocyte *trans*-infection was inhibited by a neutralizing polyclonal antibody preparation purified from the serum of an HIV-1 patient (polyclonal IgG no. 44) (Fig. 5D). These data clearly demonstrate that HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes in *trans* was not resistant to HIV-1 neutralization. Our findings therefore provide strong evidence that neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies can prevent early HIV-1 cell-to-cell transfer to a much greater extent than was previously recognized.

## DISCUSSION

The importance of virus trafficking in DCs for transmission has been clearly demonstrated for HIV-1 and for other viruses, including human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and Ebola virus (1, 24, 25). In the case of HIV-1 infection, it was initially suggested that DCs could not support efficient HIV-1 replication due to intracellular restriction factors and their capacity to capture and degrade viral pathogens for antigen presentation (26, 34, 36). However, the potential modulation of HIV-1 replication in DCs during their cross talk with various lymphocyte subsets was not taken into account when this conclusion was reached.

By directly measuring productive HIV-1 infection in each cell subset present in the cocultures of MoDCs and lymphocytes, we obtained evidence for an unexpected increase in HIV-1 replication in MoDCs. The addition of primary autologous or allogeneic CD4 T lymphocytes to HIV-1-exposed immature MoDCs effectively stimulated HIV-1 replication in the MoDCs. The increase in HIV-1 replication in MoDCs was also observed in the presence of nonactivated CD4 T lymphocytes and nonpermissive primary B lymphocytes, indicating that this phenomenon was not dependent on HIV-1 replication in lymphocytes. The virions produced in these cocultures resulted from efficient viral replication in MoDCs and were able to infect both PBMCs and immature MoDCs. Saïdi et al.

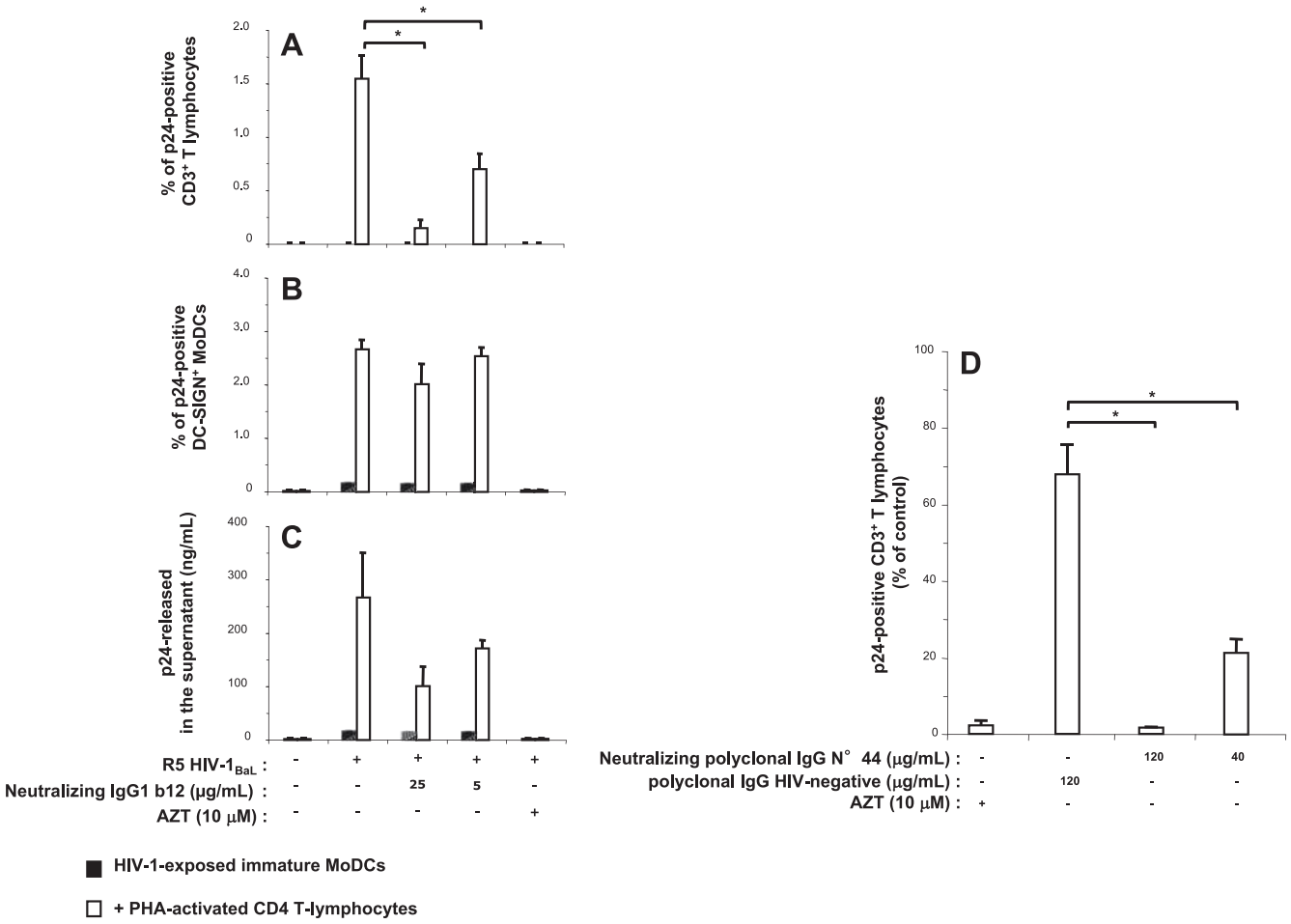



FIG. 5. Neutralizing activities of anti-HIV-1 monoclonal or polyclonaI IgGs toward the *trans*-infection of CD4 T lymphocytes. Monoclonal neutralizing IgG1b12 (A, B, and C) or polyclonal neutralizing IgG preparation no. 44 (D) was added, together with activated CD4 T lymphocytes, to HIV-1-exposed immature MoDCs. After 48 h of coculture, intracellular and extracellular p24 production levels were determined by flow cytometry and p24 ELISA, respectively. Shown are the percentages of p24-positive primary $CD3^+$ CD4 T lymphocytes (A and D) and of p24-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs (B) and amounts of viral p24 released into the supernatant (C) when HIV-1-exposed immature MoDCs were cultured with or without activated CD4 T lymphocytes in the presence or absence of neutralizing IgGs or AZT. The values shown are the means ± SD of triplicate results. Purified neutralizing polyclonal IgGs were obtained from the serum of HIV-1-positive asymptomatic patient no. 44, and nonneutralizing polyclonal IgGs were obtained from a pool of sera from HIV-1-negative healthy donors. A value of $P$ of $<0.05$ was considered significant. *, $P < 0.05$ versus the corresponding control group.

recently reported that cross talk between activated NK cells and MoDCs induces the accumulation of HIV-1 DNA in MoDCs and significantly increases HIV-1 production in immature MoDCs (48). These data indicate that HIV-1 replication in immature MoDCs may be induced by interaction with different leukocyte populations. Interestingly, we detected no enhancement of HIV-1 replication in MoDCs cocultured with various human transformed CD4 T-lymphocyte cells, although infected MoDCs efficiently transfer infectious R5 or X4 HIV-1 particles to these CD4 T cells (data not shown) (2, 62), further indicating that HIV-1 transfer to CD4 T target cells and stimulation in DCs are not necessary associated. Moreover, we observed a similar increase in HIV-1 replication when LCs and intDCs were cocultured with primary CD4 T lymphocytes, whereas no such increase was observed when the cells were cocultured with human transformed CD4 T cells (unpublished results). As immature LCs and intDCs are considered to be among the first targets of HIV-1 *in vivo* after sexual transmission, this increase in HIV-1 replication may be of physiological relevance. De Witte et al. found epithelial LCs to be refractory to HIV infection and transmission and proposed a mechanism of HIV capture and degradation involving langerin (10). Their results contrast with our observation of efficient HIV replication and transfer in LCs and intDCs. This discrepancy may be attributed to differences in the experimental culture conditions used: the concentrations of input virus and the origins of the LCs used (LCs isolated from skin versus LCs differentiated from cord blood CD34 stem cells). Nonetheless, we and others have shown that LCs are infected *in vitro* and can transmit HIV particles to CD4 T cells (11, 27–29). In addition, LCs and memory T lymphocytes emigrating from human skin explants have been found to facilitate productive HIV-1 infection (43), consistent with our results.

In our kinetic experiments, in which primary CD4 T or B lymphocytes were added at different time points, the detection of an increased viral mRNA level after lymphocyte addition is consistent with the stimulation of an early step of HIV-1 RNA reverse transcription in MoDCs. Using cell culture inserts, we showed that cell-to-cell contact was required. DC-lymphocyte interactions are known to lead to the formation of an IS. This IS involves the local reorganization of an array of receptors (e.g., CD3, CD4, CD8, talin, ICAM-1, DC-SIGN, and CD40/CD40L) that may vary with the lymphocyte phenotype and the presence or absence of antigens (5, 45, 51). Such interactions are important for immunological cross talk between DCs and T or B lymphocytes (30, 31, 45, 51). We investigated whether these interactions triggered early stages of HIV-1 replication in immature MoDCs. The abolition of IS formation (T-cell receptor-CD3 or ICAM-1-LFA-1 cell interactions) mediated by antibodies directed against CD3 or ICAM-1 prevented the stimulation of HIV-1 replication in MoDCs cocultured with primary CD4 T lymphocytes. In contrast, the addition of monoclonal antibody against ICAM-3 to infected MoDCs cocultured with CD4 T lymphocytes had no effect on HIV replication in DCs. Others have shown that blocking ICAM-1-LFA-1 interactions on primary CD4 T lymphocytes significantly decreases HIV-1 transmission from immature DCs to lymphocytes but that blocking ICAM-2 and ICAM-3 does not inhibit DC-mediated HIV-1 transfer (49, 58). Furthermore, the insertion of ICAM-1 into HIV-1 particles enhances the infection of CD4 T lymphocytes expressing LFA-1 (12, 55). The importance of such interactions for HIV-1 transmission has been highlighted by the results of *in vitro* HIV transfer experiments using primary lymphocytes from leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1) patients harboring LFA-1 defects (17). The absence of LFA-1 results in the impairment of HIV-1 replication, cell-to-cell viral transfer, and the formation of virological synapses (47). In addition to its role in cell-to-cell adhesion during antigen presentation or cross talk, ICAM-1 may be involved in signal transduction across cell membranes, like gene transcription, as suggested previously (23), or in the modulation of restriction factor activity.

The agonist monoclonal antibody against the human CD40 receptor inhibited HIV-1 replication in MoDCs in the presence of CD4 T or B lymphocytes. This antibody is known to mimic CD40-CD40L engagement, which upregulates the maturation markers CD86 and CD83 and increases APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) expression (40). The resulting increase in the amount of APOBEC3G in the cell is correlated with an increase in resistance to HIV-1 infection (38). Thus, CD40 engagement on infected MoDCs triggers the production of APOBEC3G, which is involved in decreasing HIV-1 replication and infectivity (41, 50). Similarly, in our experiments, the addition of human anti-CD40 monoclonal antibody to HIV-1-exposed immature MoDCs induced MoDC maturation, potentially accounting for the inhibition of HIV-1 stimulation in MoDCs. Conversely, the productive infection of DCs with HIV-1 may be stimulated by unknown retrograde signals delivered to DCs by primary lymphocytes, which may downregulate or inhibit intracellular HIV-1 restriction factors, such as APOBEC3G (41, 54) or the unknown factor counteracted by Vpx (15). Other factors may also modify the life cycle of HIV-1 in DCs. The upregulation of transcription factors, such as NF-κB, in infected DCs may also account for efficient HIV replication in cocultured DCs, as shown following the formation of syncytia between infected DCs and memory CD4 T lymphocytes (16). Moreover, these heterologous syncytia contain high levels of active Rel and Sp1 factors, likely to induce strong stimulation of the HIV-1 promoter, leading to high levels of virion production (16). In contrast to findings for cells in the presence of PHA-activated CD4 T lymphocytes, no syncytium formation or DC-SIGN$^+$ CD3$^+$ or CD20$^+$ cells in the presence of nonactivated CD4 T or B lymphocytes were observed by microscopy or flow cytometry 2 days after infection (data not shown), although HIV-1 replication was enhanced in MoDCs. This discrepancy between HIV-1 replication and cell conjugate formation demonstrates that HIV-1 stimulation in DCs may be mediated by different mechanisms involving an exchange of information during syncytium formation that cannot in itself account for the stimulation of HIV-1 replication. As the HIV-1 particles taken up by DCs are rapidly degraded in endolysosomal compartments (7, 62), the addition of primary lymphocytes may affect the fate of these incoming viruses, allowing them to evade the degradation process. Alternatively, a more efficient route of viral entry in the nonlysosomal compartment or higher integration efficiency may contribute to the increase in HIV-1 replication in DCs. *In vivo*, the enhancement of HIV-1 replication in immature DCs surrounded by lymphocytes may create a favorable environment for HIV-1 transmission, dissemination, and persistence. It may also be highly detrimental to the immune system, as HIV-1 replication in DCs may hijack immune functions of these cells, thus disrupting the early innate immune response and the initiation of adaptive immunity to HIV-1 (3, 42). Thus, an understanding of the precise mechanism responsible for the stimulation of HIV-1 replication would facilitate the development of inhibitors of HIV-1 replication in DCs.

As the HIV-1 *trans*-infection of CD4 T target cells plays an important role in the propagation of infection, we also evaluated virus transmission to primary CD4 T lymphocytes in coculture. Productive HIV-1 *trans*-infection of activated CD4 T lymphocytes was detected in the coculture on day 1 after infection. The percentage of infected CD4 T lymphocytes decreased with increasing duration of the period of infection of immature MoDCs. Consistent with this pattern, the number of new viral particles released into the supernatant of the coculture also decreased as a function of the duration of DC infection (data not shown). Pope et al. also showed that viral p24 antigen release into the supernatant decreased with increasing duration of the period of incubation of T lymphocytes with infected DCs (44). Cavrois et al. recently investigated this aspect further, using a virion-based HIV-1 fusion assay. They confirmed that levels of R5 or X4 HIV-1 transmission decreased sharply when virions were presented by immature or mature MoDCs incubated with HIV-1 for up to 120 min at 37°C before the addition of CD4 T cells (8).

We have shown previously that neutralizing monoclonal antibodies strongly inhibit the HIV-1 infection of immature MoDCs (20, 21). In this study, we assessed the capacity of neutralizing IgGs to inhibit HIV-1 transfer from immature MoDCs to primary CD4 T lymphocytes. By analyzing the percentages of infected DCs and CD4 T lymphocytes, we showed

that neutralizing IgGs strongly inhibited the infection of primary CD4 T lymphocytes, with no marked effect on HIV-1 replication in MoDCs. Moreover, HIV-1 particles continued to be released into the supernatant in the presence of neutralizing antibodies. Thus, the determination of viral p24 antigen levels in the coculture medium underestimated the inhibition of HIV-1 cell-to-cell transfer by antibodies. Thus, quantification of the HIV-1 released into the supernatant is not a reliable method for assessing the inhibition of HIV-1 transfer by antibodies. Our findings may explain some of the discrepancies among previous reports concerning the capacity of antibodies to inhibit HIV-1 transfer (7, 9, 13, 14). The efficient inhibition of HIV-1 transfer by neutralizing antibodies described here opens up new perspectives in the search for an effective HIV-1 vaccine. Indeed, one of the primary goals of vaccination should be the induction of HIV-1-specific antibodies at mucosal sites, to block DC infection and viral transfer from DCs to CD4 T cells.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Lisa Chakrabarti from the Pasteur Institute (Unité d'Immunogénétique Cellulaire) in Paris for fruitful discussions and for critically reading the manuscript. We thank J. Penichon at the Institute of Virology in Strasbourg for his excellent technical assistance. Special thanks go to D. Mirisky and I. Nisand (Gynecology and Maternity Department) at the University Hospital Center in Strasbourg-Hautepierre for supplying cord blood samples from healthy donors.

V.H., A.-M.A., and C.M. conceived and designed the experiments; K.X., V.H., M.P., A.L., M.E.B., M.D., S.S., T.D., and G.L. performed the experiments; M.P., K.X., V.H., and M.E.B. analyzed data; S.S., T.D., K.X., and G.L. contributed reagents/materials/analysis tools; and V.H., A.-M.A., and C.M. wrote the paper.

This work was supported by funds from EuroNeut 41 (grant no. FP7-HELTH-2007-A-201038), EuroPrise (grant no. LSHP-CT-2006-037611), ANRS, and Dormeur Investment Service Ltd. M.P. and K.X. were supported by scholarships from Sidaction and from EuroPrise, respectively.

We declare that we have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. **Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado.** 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in *cis* and in *trans*. J. Virol. **76:**6841–6844.
2. **Arrighi, J. F., M. Pion, E. Garcia, J. M. Escola, Y. van Kooyk, T. B. Geijtenbeek, and V. Piguet.** 2004. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. J. Exp. Med. **200:**1279–1288.
3. **Balkow, S., F. Krux, K. Loser, J. U. Becker, S. Grabbe, and U. Dittmer.** 2007. Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs contact to naive T cells, and favors expansion of regulatory T cells. Blood **110:**3949–3958.
4. **Banchereau, J., and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature **392:**245–252.
5. **Brossard, C., V. Feuillet, A. Schmitt, C. Randriamampita, M. Romao, G. Raposo, and A. Trautmann.** 2005. Multifocal structure of the T cell-dendritic cell synapse. Eur. J. Immunol. **35:**1741–1753.
6. **Burrer, R., S. Haessig-Einius, A. M. Aubertin, and C. Moog.** 2003. Polyclonal immunoglobulin G from patients neutralizes human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by binding free virions, but without interfering with an initial CD4-independent attachment of the virus to primary blood mononuclear cells. J. Virol. **77:**11385–11397.
7. **Cavrois, M., J. Neidleman, and W. C. Greene.** 2008. The Achilles heel of the Trojan horse model of HIV-1 *trans*-infection. PLoS Pathog. **4:**e1000051.
8. **Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, and W. C. Greene.** 2007. In vitro derived dendritic cells *trans*-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. PLoS Pathog. **3:**e4.
9. **Chen, P., W. Hubner, M. A. Spinelli, and B. K. Chen.** 2007. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. J. Virol. **81:**12582–12595.
10. **De Witte, L., A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. A. de Jong, T. de Gruijl, V. Piguet, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek.** 2007. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. Nat. Med. **13:**367–371.
11. **Fahrbach, K. M., S. M. Barry, S. Ayehunie, S. Lamore, M. Klausner, and T. J. Hope.** 2007. Activated CD34-derived Langerhans cells mediate transinfection with human immunodeficiency virus. J. Virol. **81:**6858–6868.
12. **Fortin, J. F., R. Cantin, G. Lamontagne, and M. Tremblay.** 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. J. Virol. **71:**3588–3596.
13. **Frankel, S. S., R. M. Steinman, N. L. Michael, S. R. Kim, N. Bhardwaj, M. Pope, M. K. Louder, P. K. Ehrenberg, P. W. Parren, D. R. Burton, H. Katinger, T. C. VanCott, M. L. Robb, D. L. Birx, and J. R. Mascola.** 1998. Neutralizing monoclonal antibodies block human immunodeficiency virus type 1 infection of dendritic cells and transmission to T cells. J. Virol. **72:**9788–9794.
14. **Ganesh, L., K. Leung, K. Lore, R. Levin, A. Panet, O. Schwartz, R. A. Koup, and G. J. Nabel.** 2004. Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. J. Virol. **78:**11980–11987.
15. **Goujon, C., V. Arfi, T. Pertel, J. Luban, J. Lienard, D. Rigal, J. L. Darlix, and A. Cimarelli.** 2008. Characterization of simian immunodeficiency virus SIVSM/human immunodeficiency virus type 2 Vpx function in human myeloid cells. J. Virol. **82:**12335–12345.
16. **Granelli-Piperno, A., M. Pope, K. Inaba, and R. M. Steinman.** 1995. Coexpression of NF-κB/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92:**10944–10948.
17. **Groot, F., T. W. Kuijpers, B. Berkhout, and E. C. de Jong.** 2006. Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to T cells of LAD-1 patients is impaired due to the defect in LFA-1. Retrovirology **3:**75.
18. **Gummuluru, S., V. N. KewalRamani, and M. Emerman.** 2002. Dendritic cell-mediated viral transfer to T cells is required for human immunodeficiency virus type 1 persistence in the face of rapid cell turnover. J. Virol. **76:**10692–10701.
19. **Haase, A. T.** 2005. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. Nat. Rev. Immunol. **5:**783–792.
20. **Holl, V., M. Peressin, T. Decoville, S. Schmidt, S. Zolla-Pazner, A. M. Aubertin, and C. Moog.** 2006. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. J. Virol. **80:**6177–6181.
21. **Holl, V., M. Peressin, S. Schmidt, T. Decoville, S. Zolla-Pazner, A. M. Aubertin, and C. Moog.** 2006. Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. Blood **107:**4466–4474.
22. **Hu, J., M. B. Gardner, and C. J. Miller.** 2000. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. J. Virol. **74:**6087–6095.
23. **Hubbard, A. K., and R. Rothlein.** 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. Free Radic. Biol. Med. **28:**1379–1386.
24. **Igakura, T., J. C. Stinchcombe, P. K. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. Bangham.** 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. Science **299:**1713–1716.
25. **Jones, K. S., C. Petrow-Sadowski, Y. K. Huang, D. C. Bertolette, and F. W. Ruscetti.** 2008. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of $CD4^+$ T cells. Nat. Med. **14:**429–436.
26. **Jones, L., D. McDonald, and D. H. Canaday.** 2007. Rapid MHC-II antigen presentation of HIV type 1 by human dendritic cells. AIDS Res. Hum. Retroviruses **23:**812–816.
27. **Kawamura, T., F. O. Gulden, M. Sugaya, D. T. McNamara, D. L. Borris, M. M. Lederman, J. M. Orenstein, P. A. Zimmerman, and A. Blauvelt.** 2003. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **100:**8401–8406.
28. **Kawamura, T., S. E. Kurtz, A. Blauvelt, and S. Shimada.** 2005. The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV. J. Dermatol. Sci. **40:**147–155.
29. **Kawamura, T., Y. Koyanagi, Y. Nakamura, Y. Ogawa, A. Yamashita, T. Iwamoto, M. Ito, A. Blauvelt, and S. Shimada.** 2008. Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV. J. Immunol. **180:**3297–3304.
30. **Koopman, G., H. K. Parmentier, H. J. Schuurman, W. Newman, C. J. Meijer, and S. T. Pals.** 1991. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. J. Exp. Med. **173:**1297–1304.
31. **Kushnir, N., L. Liu, and G. G. MacPherson.** 1998. Dendritic cells and resting B cells form clusters in vitro and in vivo: T cell independence, partial LFA-1 dependence, and regulation by cross-linking surface molecules. J. Immunol. **160:**1774–1781.
32. **Li, M., F. Gao, J. R. Mascola, L. Stamatatos, V. R. Polonis, M. Koutsoukos, G. Voss, P. Goepfert, P. Gilbert, K. M. Greene, M. Bilska, D. L. Kothe, J. F. Salazar-Gonzalez, X. Wei, J. M. Decker, B. H. Hahn, and D. C. Montefiori.**

2005. Human immunodeficiency virus type 1 *env* clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. J. Virol. **79:**10108–10125.
33. **McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope.** 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. Science **300:**1295–1297.
34. **Mellman, I., and R. M. Steinman.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell **106:**255–258.
35. **Moog, C., C. Spenlehauer, H. Fleury, F. Heshmati, S. Saragosti, F. Letourneur, A. Kirn, and A. M. Aubertin.** 1997. Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro. AIDS Res. Hum. Retroviruses **13:**19–27.
36. **Moris, A., A. Pajot, F. Blanchet, F. Guivel-Benhassine, M. Salcedo, and O. Schwartz.** 2006. Dendritic cells and HIV-specific $CD4^+$ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. Blood **108:**1643–1651.
37. **Orentas, R. J., and J. E. Hildreth.** 1993. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. AIDS Res. Hum. Retroviruses **9:**1157–1165.
38. **Peng, G., T. Greenwell-Wild, S. Nares, W. Jin, K. J. Lei, Z. G. Rangel, P. J. Munson, and S. M. Wahl.** 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. Blood **110:**393–400.
39. **Perfetto, S. P., D. Ambrozak, R. Nguyen, P. Chattopadhyay, and M. Roederer.** 2006. Quality assurance for polychromatic flow cytometry. Nat. Protoc. **1:**1522–1530.
40. **Pido-Lopez, J., T. Whittall, Y. Wang, L. A. Bergmeier, K. Babaahmady, M. Singh, and T. Lehner.** 2007. Stimulation of cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up-regulates APOBEC3G expression in $CD4^+$ T cells and dendritic cells. J. Immunol. **178:**1671–1679.
41. **Pion, M., A. Granelli-Piperno, B. Mangeat, R. Stalder, R. Correa, R. M. Steinman, and V. Piguet.** 2006. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. J. Exp. Med. **203:** 2887–2893.
42. **Pollara, G., A. Kwan, P. J. Newton, M. E. Handley, B. M. Chain, and D. R. Katz.** 2005. Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective? Int. J. Exp. Pathol. **86:**187–204.
43. **Pope, M., M. G. H. Betjes, N. Romani, H. Hirmand, P. U. Cameron, L. Hoffman, S. Gezelter, G. Schuler, and R. M. Steinman.** 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. Cell **78:**389–398.
44. **Pope, M., S. Gezelter, N. Gallo, L. Hoffman, and R. M. Steinman.** 1995. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory $CD4^+$ T cells. J. Exp. Med. **182:**2045–2056.
45. **Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour, and A. Trautmann.** 2001. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. Nat. Immunol. **2:**925–931.
46. **Rouet, F., D. K. Ekouevi, M. L. Chaix, M. Burgard, A. Inwoley, T. D. Tony, C. Danel, X. Anglaret, V. Leroy, P. Msellati, F. Dabis, and C. Rouzioux.** 2005. Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. J. Clin. Microbiol. **43:**2709–2717.
47. **Rudnicka, D., J. Feldmann, F. Porrot, S. Wietgrefe, S. Guadagnini, M. C. Prévost, J. Estaquier, A. T. Haase, N. Sol-Foulon, and O. Schwartz.** 2009. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. J. Virol. **83:**6234–6246.
48. **Saïdi, H., M. T. Melki, and M. L. Gougeon.** 2008. HMGB1-dependent triggering of HIV-1 replication and persistence in dendritic cells as a consequence of NK-DC cross-talk. PLoS One **3:**e3601.
49. **Sanders, R. W., E. C. de Jong, C. E. Baldwin, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, and B. Berkhout.** 2002. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. J. Virol. **76:**7812–7821.
50. **Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature **418:**646–650.
51. **Shishkova, Y., H. Harms, G. Krohne, E. Avota, and S. Schneider-Schaulies.** 2007. Immune synapses formed with measles virus-infected dendritic cells are unstable and fail to sustain T cell activation. Cell. Microbiol. **9:**1974–1986.
52. **Sowinski, S., C. Jolly, O. Berninghausen, M. A. Purbhoo, A. Chauveau, K. Kohler, S. Oddos, P. Eissmann, F. M. Brodsky, C. Hopkins, B. Onfelt, Q. Sattentau, and D. M. Davis.** 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. Nat. Cell Biol. **10:**211–219.
53. **Spira, A. I., P. A. Marx, B. K. Patterson, J. Mahoney, R. A. Koup, S. M. Wolinsky, and D. D. Ho.** 1996. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. J. Exp. Med. **183:**215–225.
54. **Stopak, K. S., Y. L. Chiu, J. Kropp, R. M. Grant, and W. C. Greene.** 2007. Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. J. Biol. Chem. **282:**3539–3546.
55. **Tardif, M. R., and M. J. Tremblay.** 2003. Presence of host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 virions increases productive infection of $CD4^+$ T lymphocytes by favoring cytosolic delivery of viral material. J. Virol. **77:**12299–12309.
56. **Turville, S. G., M. Aravantinou, H. Stossel, N. Romani, and M. Robbiani.** 2008. Resolution of *de novo* HIV production and trafficking in immature dendritic cells. Nat. Methods **5:**75–85.
57. **Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham.** 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. Blood **103:** 2170–2179.
58. **Wang, J. H., C. Kwas, and L. Wu.** 2009. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission. J. Virol. **83:**4195–4204.
59. **Wiley, R. D., and S. Gummuluru.** 2006. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 *trans* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103:**738–743.
60. **Wu, L.** 2008. Biology of HIV mucosal transmission. Curr. Opin. HIV AIDS **3:**534–540.
61. **Wu, L., and V. N. KewalRamani.** 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. Nat. Rev. Immunol. **6:**859–868.
62. **Yu, H. J., M. A. Reuter, and D. McDonald.** 2008. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. PLoS Pathog. **4:**e1000134.

# Publication 2

# Les anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs inhibent efficacement la réplication du VIH-1 dans les cellules dendritiques interstitielles et de Langerhans.

Neutralizing and non-neutralizing inhibitory IgG efficiently inhibit HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells.

Maryse Peressin, Vincent Holl, Sylvie Schmidt, Thomas Decoville, Danielle Mirinsky, Alexandre Lederle, Maryse Delaporte, Xu Ke , Anne-Marie Aubertin and Christiane Moog.

*Journal of Virology, 2011.*

Les précédents travaux du laboratoire ont permis de montrer que l'infection des MDDC par le VIH-1 pouvait être inhibée efficacement par les anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs. Puisque la transmission par voie sexuelle est le mode de transmission le plus fréquent du VIH-1, l'activité inhibitrice de tels anticorps a été recherché lorsque des cellules de Langerhans (LC) ou les cellules dendritiques interstitielles (intDC) sont les cibles du VIH-1.

Les LC et les intDC ont été différenciée à partir de cellules $CD34^+$ isolées du sang de cordon ombilical, et présentent un phénotype similaire aux cellules retrouvées *in vivo* au niveau des muqueuses. Les résultats de cette étude montrent que l'infection des LC et intDC par le VIH-1 est inhibée par les anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs *in vitro*. Comme pour les MDDC, le mécanisme d'inhibition de l'infection de ces cellules repose sur deux propriétés des anticorps : l'activité neutralisante et l'inhibition dépendante des RFc.

Ainsi, la similarité des cellules de ce modèle avec les cellules présentes aux muqueuses, et l'efficacité de protection de ces cellules par les anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs suggère que de tels anticorps devraient être induits par vaccination afin de protéger ces cellules contre l'infection par le VIH-1 lors de la transmission du virus par voie sexuelle.

JOURNAL OF VIROLOGY, Jan. 2011, p. 1077–1085 Vol. 85, No. 2
0022-538X/11/$12.00 doi:10.1128/JVI.01619-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

# HIV-1 Replication in Langerhans and Interstitial Dendritic Cells Is Inhibited by Neutralizing and Fc-Mediated Inhibitory Antibodies▽†

M. Peressin,[1]* V. Holl,[1] S. Schmidt,[1] T. Decoville,[1] D. Mirisky,[2] A. Lederle,[1] M. Delaporte,[1] K. Xu,[1] A. M. Aubertin,[1] and C. Moog[1]

*INSERM-UDS, Institute of Virology, Faculté de Médecine, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France,[1] and Service of Gynecology and Obstetrics of Professor I. Nisand, Hautepierre Hospital (CHU), Avenue Molière, F-67200 Strasbourg, France[2]*

Received 3 August 2010/Accepted 1 November 2010

**Langerhans cells (LCs) and interstitial dendritic cells (IDCs) may be among the first human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) targets after sexual transmission. We generated cells of these types by differentiation of purified CD34$^+$ cord blood cells. After *in vitro* infection with R5-tropic strains, we obtained similar percentages of infected cells for both dendritic cell (DC) subsets. Moreover, LC infection was not increased by blockage of langerin by antilangerin. These results indicate that, under our experimental conditions, there was no evidence of any preference of HIV replication in LCs versus IDCs. The inhibitory activity of HIV-1-specific IgAs and IgGs against HIV-1 replication in LCs and IDCs was analyzed. We found that neutralizing antibodies inhibit HIV-1 infection of both DC subsets. Interestingly, HIV-1 was inhibited more efficiently by the IgGs than the corresponding IgA, due to an Fcγ receptor-dependent mechanism. Moreover, nonneutralizing inhibitory IgGs were able to inhibit infection of both LCs and IDCs. These results underline the importance of HIV-1 inhibition by the binding of the Fc part of IgGs to Fcγ receptors and suggest that the induction of neutralizing and nonneutralizing inhibitory IgGs in addition to neutralizing IgAs at mucosal sites may contribute to protection against sexual transmission of HIV-1.**

Currently, sexual transmission is the major route of new human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. One of the promising new strategies for vaccination against HIV sexual infection is the development of a mucosal vaccine to induce strong local and systemic protective immunity. Such immunity should prevent infection of the first HIV target cells at mucosal sites, particularly Langerhans cells (LCs), interstitial dendritic cells (IDCs), macrophages, and T lymphocytes (32). Five monoclonal neutralizing antibodies (NAbs) have been studied extensively (IgG1 b12, 2F5, 4E10, 447-52D, and 2G12), and additional candidate NAbs have recently been discovered (37, 38). These NAbs inhibit a broad spectrum of HIV-1 strains *in vitro*, as assessed using conventional neutralization assays with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or HIV-1-permissive cell lines (TZM-bl) (3, 26, 37). We have previously demonstrated that NAbs have an *in vitro* inhibitory activity by using two types of antigen-presenting cells (APCs): monocyte-derived macrophages (MDMs) and monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) (15, 17). The inhibitory activity of neutralizing antibodies on these target cells was due to two distinct mechanisms of inhibition: (i) classical neutralization of the virus infectivity involving the Fab part of the antibody (Ab) and (ii) an Fcγ receptor (FcγR)-dependent mechanism of inhibition. Moreover, other Abs, which did not show classical neutralizing activity, were able to inhibit HIV-1 replication in these cells by the FcγR-dependent mechanism only. These Abs are referred to as nonneutralizing inhibitory Abs (NNIAbs) (16).

The protective role of neutralizing IgGs has been confirmed *in vivo* using passive immunization of macaques against a vaginal simian-human immunodeficiency virus (SHIV) challenge (1, 11). More recently, even lower concentrations of NAbs showed protection in a modified challenge protocol involving repeated low doses of simian immunodeficiency virus (SIV) or SHIV (12, 28). Passive-transfer studies of NAbs implicate the Fc part of IgGs in the protection against mucosal infection. Indeed, the protection was significantly lower after passive transfer of the IgG1 b12 mutant LALA (devoid of the capacity to bind to FcγRs) than of the wild-type (WT) b12 strain (11). These results suggest that the Fc region of neutralizing IgGs plays a role in the protection against sexual transmission of HIV.

It has been suggested that Fc-bearing LCs and IDCs in the mucosa are among the first HIV targets following sexual transmission. Although their exact contribution to HIV transmission is controversial, they have been found infected in the mucosal layer (14, 31) and are able to replicate HIV *in vitro* (4, 14, 19, 24, 25). These FcγR-bearing immune cells display important immune functions. They are involved in the capture and the degradation of HIV-1 IgG immune complexes and in the induction of immune effector functions, such as antigen presentation (2). Thus, inhibiting infection of LCs and IDCs and preserving their immune function may make a valuable contribution to protection against HIV-1 infection and dissemination through the body. Using antibodies to protect these cells from infection should therefore be investigated.

* Corresponding author. Mailing address: INSERM-UDS, Institute of Virology, Faculté de Médecine, 3 rue Koeberlé, F-67000 Strasbourg, France. Phone: 33 (0)3 68 86 37 42. Fax: 33 (0)3 68 85 37 24. E-mail: maryse.peressin@unistra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at http://jvi.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 17 November 2010.

There have been few studies of the inhibitory effect of antibodies on antigen-presenting cells and, to our knowledge, no studies of the inhibitory effects of antibody against infection of LCs and IDCs. These particular dendritic cells (DCs) differentially express HIV-1 alternative receptors compared to MDDCs (for example, C-type lectin receptors [CLRs], such as DC-SIGN or langerin). Moreover, the relative expression of the various FcγRs differs from that in MDDCs. These differences may affect HIV binding to the cells, with consequences for HIV replication and the inhibitory capacity of Abs.

We report an analysis of HIV replication in LCs and IDCs and the neutralizing and Fc-mediated inhibitory activity of Abs on the infection of these cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Antibodies and cytokines. (i) MAbs used for LC and IDC staining.** Monoclonal antibodies (MAbs) HLA-DR–phycoerythrin (PE) (G46-6), CD1a-PC5 (BL6), CD11b-allophycocyanin-Cy7 (ICRF44), CD16-PE (3G8), CD83-PE (HB15e), CD206-PC5 (19.2), and DC-SIGN–allophycocyanin (DCN46) were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA). MAbs CD14-fluorescein isothiocyanate (FITC) (RMO52), CD64-PC5 (clone 22), CD207-PE (DCGM04), and p24-FITC (KC57) were purchased from Beckman-Coulter (Roissy, France).

**(ii) HIV-1-specific Abs.** Anti-HIV-1 human MAbs to gp-120 (IgG1 b12 and 2G12) and to gp-41 (2F5) were obtained from the NIBSC. Human MAb 447-52D and corresponding Fab fragments 240D and 246D were provided by Suzan Zolla-Pazner. Human MAbs 4E10 and IgA b12 were provided by H. Katinger (Polymun Scientific GmbH) and D. Burton, respectively. Nonneutralizing non-inhibitory MAbs to gp-41 (5F3 and 3D6) were obtained from the NIH and D. Katinger (Polymun Scientific GmbH), respectively.

**(iii) Anti-human langerin Abs.** Mouse monoclonal anti-human langerin (clone DCGM04) was purchased from Beckman-Coulter (Roissy, France). Mouse monoclonal anti-human langerin (clone 343828) and goat polyclonal anti-human langerin were purchased from R&D Systems.

**(iv) Cytokines.** All cytokines used for culture and differentiation of the cells were purchased from R&D Systems.

**Cell preparation.** PBMCs were obtained by Ficoll-Hypaque sedimentation of human peripheral blood leukocytes, followed by 3 days of phytohemagglutinin (PHA) activation in RPMI medium-10% fetal calf serum (FCS) supplemented with interleukin-2 (IL-2) (10 ng/ml).

Langerhans cells (LCs) and interstitial dendritic cells (IDCs) were obtained by differentiation of purified human cord blood $CD34^+$ stem cells by immunomagnetic bead isolation (AutoMacs; Miltenyi Biotec) after Ficoll-Hypaque sedimentation. Purified $CD34^+$ cells were cultured in RPMI medium-10% FCS supplemented with 50 ng/ml of Flt3 ligand (Flt3-L), 50 ng/ml of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 25 ng/ml of stem cell factor (SCF), and 10 ng/ml of thrombopoietine (TPO) at 37°C and under 5% $CO_2$ for 7 days to allow multiplication. Then, the $CD34^+$ cells were differentiated for five additional days in RPMI medium-10% FCS with 50 ng/ml of GM-CSF, 6 ng/ml of transforming growth factor β1 (TGF-β1), and 2 ng/ml of tumor necrosis factor alpha (TNF-α).

All blood or cord blood samples were collected from healthy, HIV-1-seronegative donors. Umbilical cord blood samples were obtained from consenting, full-term pregnant women.

**Virus preparation.** HIV-1 primary isolates were produced in human blood leukocytes as previously described (16). Virus stocks were collected at the peak of virus production and were concentrated 80-fold using a 100-kDa cutoff polyethersulfone filter (Centricon 80 Plus Biomax filter; Millipore, Molsheim, France). HIV-$1_{BaL}$ and HIV-$1_{BX08}$ isolates (subtype B, R5 strains) were provided by S. Gartner, M. Popovic, and R. Gallo from the National Institutes of Health and by H. Fleury, respectively. HIV-$1_{TV1}$ (subtype C, R5 strain) was obtained from S. Engelbrecht. X4-tropic HIV-$1_{KON}$ was provided by F. Barin.

**Infection and neutralization assays.** Aliquots of 25 μl of cells (at $12 \times 10^6$ cells/ml, in RPMI medium supplemented with 10% FCS without addition of cytokines) were infected with 25 μl of HIV-1 primary isolate (concentration of 2 to 10 μg/ml p24) in a final volume of 75 μl. The concentration used was adjusted to result in 2 to 5% of infected cells after 72 h. This percentage of infected cells has been shown to be adequate for testing neutralizing antibody activity (22, 23, 33).

The neutralization assay involved preincubation of 25 μl of various concentrations of HIV-specific Abs with 25 μl of virus for 1 h at 37°C, before addition of 25 μl of cells.

After 72 h, the percentage of infected cells was determined by intracellular p24 staining in parallel with membrane staining to allow the discrimination of DC subsets. Flow cytometry analysis was performed, and the neutralizing $IC_{90}$ (the concentration of Ab which resulted in a 90% reduction in the number of infected cells) was determined. Neutralization was assessed if the percentage of infected cells was >2%. This percentage of infected cells has been shown to be appropriate for the analysis of neutralization by flow cytometry (16, 17, 30).

**Flow cytometry analysis.** Acquisition of multicolor samples was performed with a cytometer (LSRII Sorp; BD). Cytometer setup and tracking (CST) calibration particles (BD) were used to ensure consistency of fluorescence intensity measurements throughout all experiments. A flow cytometry CompBeads kit (BD) was used for compensation. Forward angle and side scatter light gating were used to exclude dead cells and debris from the analysis. Forward width and forward area were used to exclude doublet cells. FACSDiva software (BD) was used for the final analysis and graphical output.

## RESULTS

**Phenotypes of LCs and IDCs derived from $CD34^+$ cord blood cells.** To analyze the inhibitory activity of antibodies against HIV infection of LCs and IDCs, we generated these cells from $CD34^+$ stem cells *in vitro*. As the recovery of $CD34^+$ cells from cord blood is low, we first amplified them for 7 days before the 5-day differentiation step to generate LCs and IDCs (see Materials and Methods). Under these conditions, we obtained LCs and IDCs in coculture. Each cell population in the coculture was characterized by immunophenotyping (Fig. 1); LCs and IDCs were distinguished according to their specific cell surface expression markers, langerin (CD207) and CD11b, respectively (6, 34).

The $CD11b^+$/langerin-negative IDCs (Fig. 1, blue population) expressed low levels of CD1a and CD14 (10 and 22%, respectively). In contrast, 73% of $CD11b^-$/langerin-positive LCs (Fig. 1, pink population) expressed CD1a, but few were positive for CD14. A third cell population, negative for both CD11b and langerin markers, was also detected in the coculture (see Fig. SA1a in the supplemental material, gray population). We extensively analyzed these cells. They were also negative for the CD14-specific monocyte marker, for CD4 and CCR5, and for all other surface markers tested (FcγRs, FcαR, the C-type lectins DC-SIGN and mannose receptor, CD1a, and HLA-DR).

Like APCs, LCs and IDCs strongly expressed HLA-DR. The mannose receptor was detected at the cell surface of most IDCs but not LCs, and the expression of DC-SIGN was very weak on IDCs and absent on LCs. To assess the ability of LCs and IDCs to bind HIV-1 IgG immune complexes through FcγRs, we studied the expression of the different types of this receptor family. LCs and IDCs differentially expressed FcγRI (4 and 18%, respectively) and FcγRII (24 and 54%, respectively), but both expressed FcγRIII only weakly. The expression of FcαR (IgA receptor) was very weak on IDCs and not detectable on LCs (not shown).

The receptor and coreceptor for R5-tropic HIV-1 strains, CD4 and CCR5, respectively, were expressed at the surface of both DC subsets, whereas no expression of CXCR4 (coreceptor for X4-tropic HIV-1 strains) could be detected (not shown). LCs and IDCs did not express the maturation marker CD83 and were therefore considered to be immature.

The LCs and IDCs in coculture obtained by *in vitro* differ-

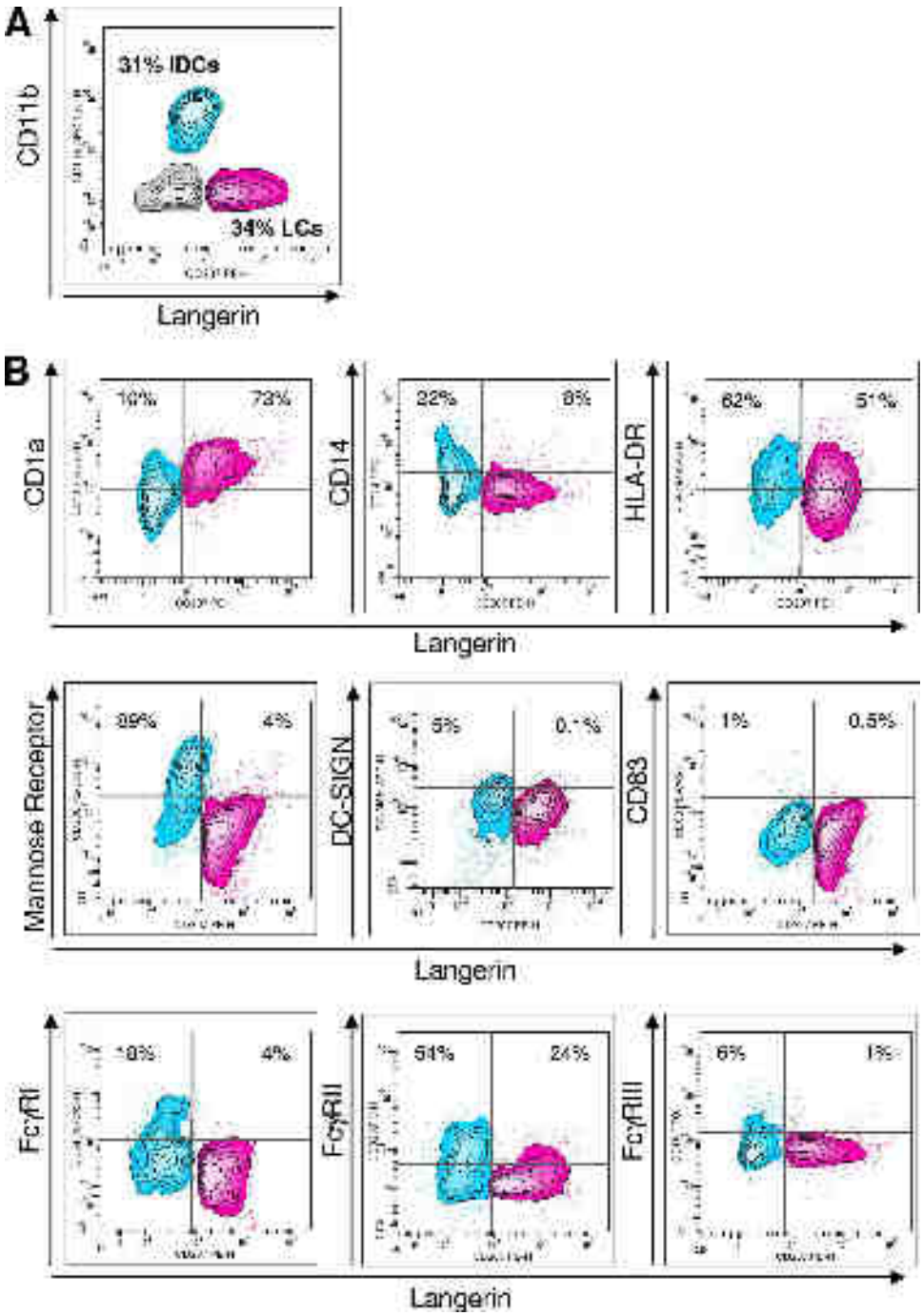



FIG. 1. Phenotypes of Langerhans cells (LCs; pink) and interstitial dendritic cells (IDCs; blue) obtained after differentiation of $CD34^+$ cord blood cells. (A) LCs and IDCs were distinguished by their expression of langerin and CD11b, respectively. (B) The expression of various markers was determined by flow cytometry (LSRII Sorp; BD) with gated populations of langerin-positive/$CD11b^-$ LCs and langerin-negative/$CD11b^+$ IDCs. Dot plots are representative of 4 different donors and 7 independent experiments.

entiation of cord blood stem cells thus showed a phenotype very similar to the phenotype previously described for DCs residing in mucosal sites (13, 35).

**Attempts to purify LCs and IDCs.** We tried to separate IDCs from LCs and also to improve their purity in culture (see Fig. SA2 in the supplemental material).

First, we modified the culture conditions and the cytokine cocktail used. Without adding TGF-β to the culture, we obtained pure IDCs, without LCs (see Fig. SA2c in the supplemental material). However, these IDCs showed a phenotype similar to that of MDDCs; in particular, unlike other IDCs, they expressed DC-SIGN. IDCs obtained in the presence of TGF-β did not express DC-SIGN (probably due to the effect of the cytokine, as reported by Relloso et al. [27]) and therefore

show a phenotype closer to that of IDCs purified from the derma.

Purification by cell sorting was also attempted (see Fig. SA2b in the supplemental material). However, the size and the morphology of the LCs obtained on days 10 to 12 were not appropriate for magnetic cell sorting (the cells stuck to the column and were recovered with deformities). Moreover, staining of the cells on day 12 before cell sorting induced rapid maturation of the cells, making them resistant to R5 HIV infection. Purification of LCs at earlier times was not feasible because langerin was expressed only weakly before day 12.

As we could not improve the purity of LCs or IDCs, cocultures were used for infection experiments.

**Productive HIV-1 infection of LCs and IDCs.** To analyze the infection of LCs and IDCs by different HIV-1 strains, we used flow cytometry to detect, in each population of DCs, intracellular p24 viral antigen, which is a reliable early indicator of productive infection (33). Flow cytometry was also used to detect the cell-specific markers langerin and CD11b for the phenotypic characterization of infected LCs and IDCs, respectively. This method discriminated between infected LCs and infected IDCs in the coculture, which is not possible by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (dosage of p24 in the supernatant). Intracellular p24 was analyzed at various times after infection (Fig. 2C). After 24 and 48 h, the percentages of LCs and IDCs infected were negligible. However, 72 h postinfection, the percentages of LCs and IDCs infected were 2 to 5% for the three R5-tropic strains (HIV-$1_{BaL}$, HIV-$1_{BX08}$, and HIV-$1_{TV1}$), but no productive infection was detected with X4 HIV-$1_{KON}$ (Fig. 2A). Although the percentage of infected IDCs was slightly higher than that of LCs, the difference was not significant for HIV replication in LCs and IDCs from various donors ($P > 0.34$ by analysis of variance [ANOVA]) (Fig. 2B). The percentage of infected cells increased with time (at days 4 and 5) (Fig. 2C) and correlated with virus released into the medium, as assessed by p24 ELISA (not shown).

To determine whether the infection detected at 72 h corresponded to a single cycle or several cycles of replication, cells were treated with saquinavir (a protease inhibitor). Saquinavir treatment decreased the numbers of infected LCs and IDCs by 25% and 30%, respectively (Fig. 2D). This indicates that virus replication detected at 72 h corresponded mainly to a single cycle of HIV replication in both DC types. To measure the kinetics of the early reverse transcription step, we added zidovudine (AZT) at various times after infection and measured the percentages of infected cells at 72 h. AZT had no detectable inhibitory effect when added up to 24 h after the virus. This indicates that the reverse transcription step of HIV-1 replication needs about 24 h to be completed in these cells (Fig. 2E). These findings also suggest that the early kinetics of replication were similar in LCs and IDCs.

No infection was detected in langerin-negative/CD11b$^-$ cells, and these cells could therefore be considered nonpermissive to HIV-1 infection (see Fig. SA1b in the supplemental material). Analysis of the inhibitory activity of antibodies after 72 h was chosen, corresponding to a single cycle of infection and minimizing the inhibitory activity due to cytokine production or other factors.

**Effect of antilangerin on HIV-1 infection of LCs.** Langerin is expressed exclusively on LCs and may participate in the degradation of viral particles, limiting HIV replication in these cells (8). The role of langerin in HIV-1 infection was assessed in our model by competition experiments using three antibodies directed against human langerin CD207 (one polyclonal and two monoclonal Abs). Anti-human langerin Ab (20 μg/ml) was preincubated with LCs and IDCs for 30 min before infection with a primary isolate of HIV-$1_{BaL}$. These Abs impeded antilangerin-PE staining by targeting the same epitope or by steric hindrance, demonstrating the efficacy of their binding (Fig. 3A). We analyzed the productive HIV-1 infection in LCs identified as CD11b$^-$ CD1a$^+$ (Fig. 3B). The presence of antilangerin Abs (either monoclonal or polyclonal) did not increase the percentages of LCs (or IDCs) infected after 3 days (Fig. 3B). Indeed, in the presence of antilangerin antibodies, the percentage of HIV-infected CD1a$^+$ LCs was slightly but not statistically significantly lower than that for controls. Under these conditions, we found no evidence of langerin being involved in LC infection. In addition, there was no significant difference between the percentages of HIV-infected LCs and IDCs (Fig. 2B), indicating that LCs were infected with an efficiency similar to that for the IDCs also present in the coculture.

**Inhibition of HIV-1 replication in DCs by HIV-1-specific Abs.** The inhibitory activity of a panel of HIV-1-specific Abs on HIV-1 replication in LCs and IDCs was evaluated. Anti-HIV-1 Abs were incubated with R5-tropic HIV-$1_{BaL}$ or HIV-$1_{TV1}$ for 1 h before the addition of LCs and IDCs. After 72 h, the percentages of infected LCs and DCs were determined and the inhibition of HIV-1 replication after Ab treatment was calculated. The $IC_{90}$ of the Abs (i.e., the concentration of Ab which resulted in a 90% reduction in the number of infected cells) was determined for infection of LCs and IDCs with either HIV-$1_{Bal}$ or HIV-$1_{TV1}$ (Table 1). The five well-known NAbs tested strongly inhibited HIV-$1_{BaL}$ and HIV-$1_{TV1}$ replication in LCs and IDCs, and their inhibitory activities were stronger than those measured on PBMCs (Table 1). Interestingly, NNIAbs 240D and 246D, which do not exhibit neutralizing activity on PBMCs, reduced the number of HIV-$1_{BaL}$-infected LCs and IDCs by 90% (39). The nonneutralizing noninhibitory Abs (NNNIAbs) 5F3 and 3D6, directed against gp41, which did not exhibit any inhibitory activity in previous assays, also had no inhibitory effects in our model system (17). Under these experimental conditions, no induction of the maturation marker CD83 at the surface of the LCs or IDCs could be detected (not shown).

**Participation of FcγRs in the inhibition of HIV-1 replication by HIV-1-specific IgGs.** As FcγRs are expressed on LCs and IDCs, we studied the role of the Fc part of Abs in binding to their cognate FcγRs. We first analyzed the inhibitory activity of the Fab part of the neutralizing monoclonal IgG 447-52D (Fig. 4A). The inhibitory activity of the Fab part of this NAb was only 1/10 that of the whole NAb. However, when PHA-stimulated PBMCs were used as target cells, the inhibition by the Fab part of 447-52D was only slightly lower than that of the whole IgG (Fig. 4A). This suggests not only that the much greater inhibition of DC infection by whole IgG than by the Fab fragment was due to a higher avidity of divalent than monovalent antibodies but also that the Fc domain of the NAb contributes substantially to the mechanism of inhibition of HIV-1 replication in LCs and IDCs. To test this possibility

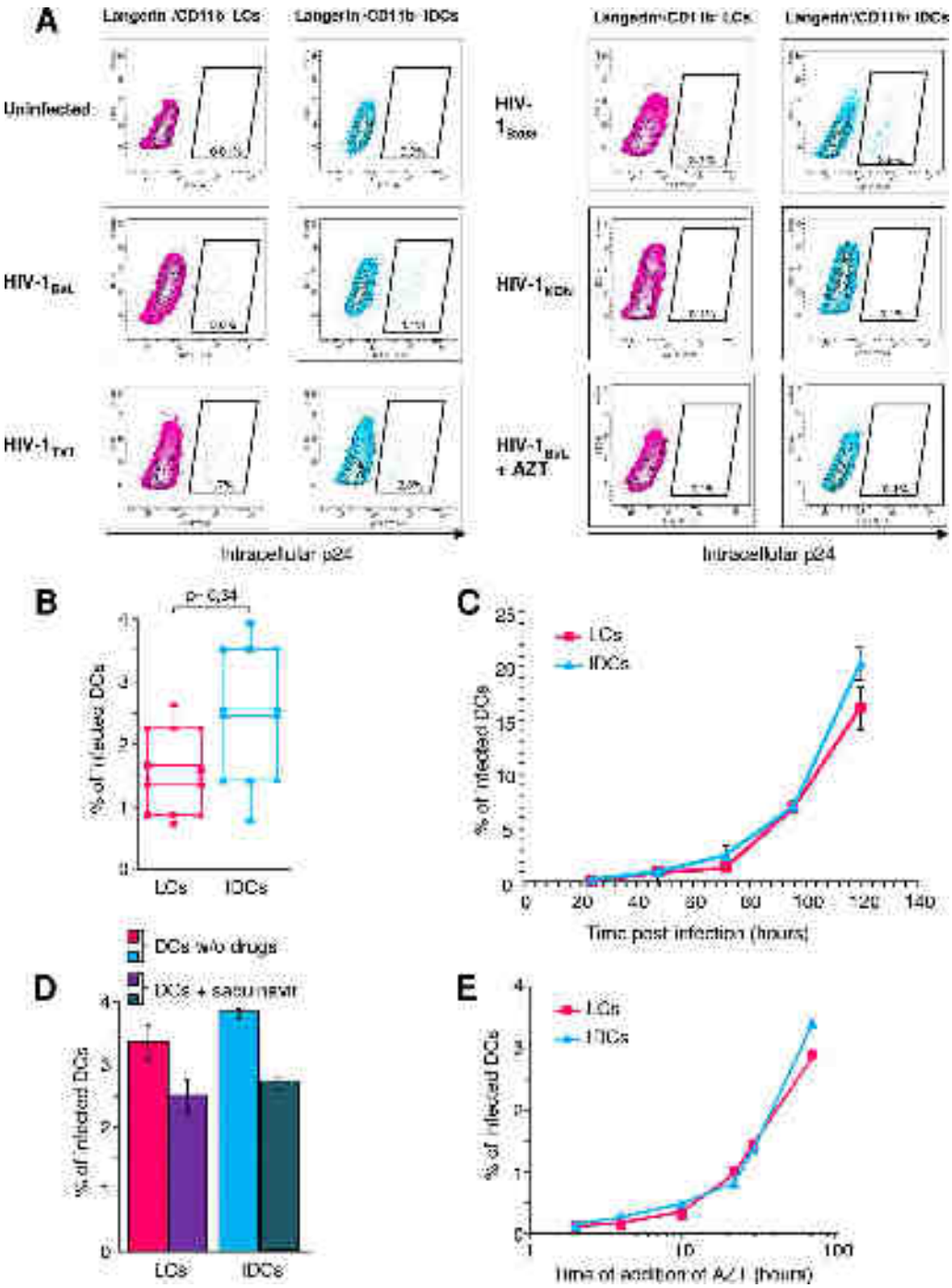



FIG. 2. HIV-1 replication in LCs and IDCs. (A) Contour plot representation of the percentages of p24-positive langerin-positive/CD11b$^-$ LCs, langerin-negative/CD11b$^+$ IDCs, and langerin-negative/CD11b$^-$ cells. Intracellular p24 was detected 72 h after infection with R5-tropic HIV-$1_{BaL}$, HIV-$1_{TV1}$, or HIV-$1_{BX08}$ or X4-tropic HIV-$1_{KON}$. AZT (10 mM) was added to inhibit productive HIV-1 replication. (B) Box plot representation of the percentages of HIV-$1_{BaL}$ infection of LCs and IDCs from 7 different donors. (C) Kinetics of infection of LCs and IDCs. DCs were infected with HIV-$1_{BaL}$, and the infection was stopped at 24, 48, 72, 96, and 120 h postinfection. The percentages of infected LCs and IDCs were scored at each time. (D) Percentages of LCs and IDCs infected by HIV-$1_{BaL}$ in the presence or absence of saquinavir. Saquinavir (5 ng/ml) was added directly after addition of the virus. Cells were incubated for 72 h, and the percentage of infected cells was determined by intracellular p24 measurement. (E) Kinetics of HIV-$1_{BaL}$ replication. AZT (10 mM) was added at different times postinfection, and the percentages of infected LCs and IDCs were scored at 72 h. Error bars indicate standard deviations.

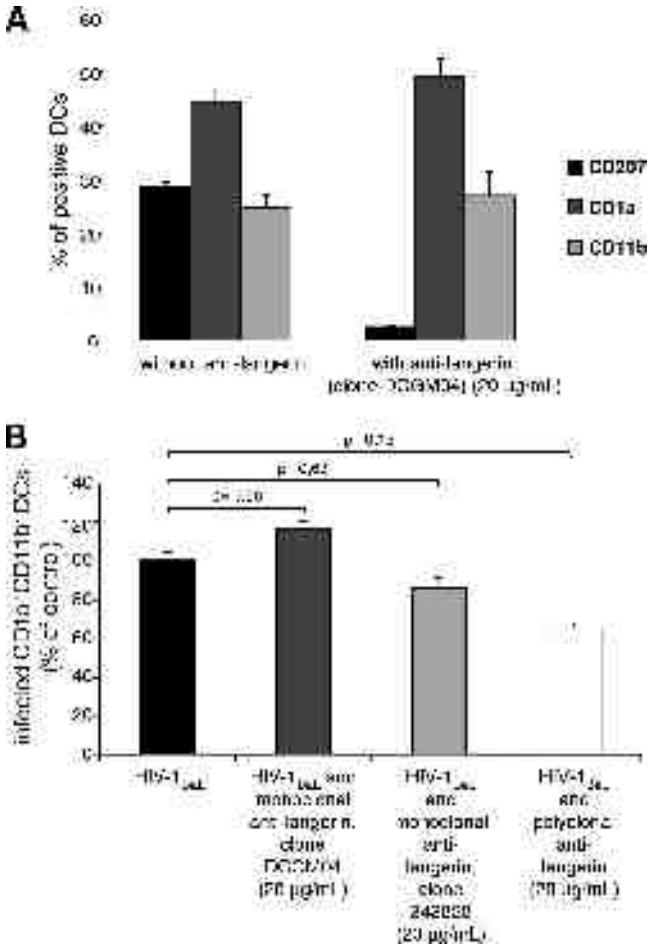



FIG. 3. Blockade of langerin on LCs. (A) Immunophenotyping in the presence of mouse anti-human langerin IgG (clone DCGM04) (20 μg/ml). CD1a and CD11b expression was not affected by the antilangerin treatment. (B) Cells were treated or not treated with various mouse or goat IgGs directed against langerin (20 μg/ml for 30 min) and then infected with HIV-$1_{BaL}$. Intracellular p24 was measured in $CD1a^+$ $CD11b^-$ LCs after 72 h. Values are representative of 4 independent experiments performed on cells from 3 different donors. Error bars indicate standard deviations.

further, we prevented the binding of the NAb to the corresponding FcγRs by preincubating LCs and IDCs with 10 μg/ml each of anti-FcγRI, anti-FcγRII, and anti-FcγRIII before addition of HIV-1 IgG immune complexes. Blocking the binding of the NAb to the FcγRs present on the cell surface of the DCs reduced the inhibitory activity of the IgG 447-52D (Fig. 4B). Although increased inhibitory activity was less clear for NAb b12 than for 447-52D (Table 1), blocking the binding of b12 to the FcγRs also induced a significant and reproducible decrease of the inhibitory activity on LCs and IDCs (not shown). These results clearly show that an FcγR-mediated inhibitory activity contributes to the inhibition of HIV-1 infection of LCs and IDCs.

In the mucosa, LCs and IDCs may encounter IgA in addition to IgGs. We evaluated inhibition by antibody b12 of the IgA type of LC and IDC infection; IgA b12 is a recombinant human IgA2 that carries the heavy plus light (H+L) chain variable domains of IgG1 b12 (21). Monomeric IgA b12 inhibited HIV-1 replication in DCs, but the inhibition was weaker than that by the corresponding IgG1 b12 (Fig. 4C and Table 1). Dimeric and polymeric IgA b12 had similar inhibitory activities (data not shown). Moreover, the inhibitory activity of IgA b12 on LCs and IDCs was of the same order of magnitude as that recorded when PBMCs were the HIV targets (Table 1) (21). These results suggest that the Fc part of IgA does not participate in inhibition of HIV and provide further support to the notion of an FcγR-mediated mechanism of HIV inhibition by IgGs.

## DISCUSSION

We studied the capacity of HIV-1-specific Abs to inhibit HIV-1 replication in LCs and IDCs. LCs and IDCs were obtained by differentiation of cord blood $CD34^+$ stem cells. Immunophenotyping of these cells showed that DCs generated under these conditions expressed the surface markers detected on DC subsets present in the mucosa. These *in vitro*-differentiated cells therefore appear to be a good model for the analysis of HIV-1 infection of LCs and IDCs from the mucosa and neutralization by antibodies.

We analyzed the first step of HIV replication in these cells, which have contrasting patterns of expression of cell surface markers, also different from that of DCs obtained after differentiation of blood monocytes (17, 29, 35). We found that the reverse transcription step and the kinetics of HIV replication were similar in LCs and IDCs and were comparable to those previously reported for MDDCs (10, 17). Treatment with saquinavir demonstrated that HIV-infected cells detected after 72 h corresponded mostly to a single cycle of virus replication. Thus, under conditions where HIV was incubated with both LCs and IDCs, the first steps of virus entry and replication were similar in both DC subtypes and there was no evidence of any preference of HIV replication.

These similarities in HIV-1 replication in LCs and IDCs

TABLE 1. Inhibition of HIV-$1_{BaL}$ and HIV-$1_{TV1}$ by NAbs and NNIAbs when LCs/IDCs were used as target cells

| Monoclonal antibody | $IC_{90}$ (μM)[a] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | HIV-$1_{BaL}$ | | | HIV-$1_{TV1}$ | | |
| | LCs | IDCs | PBMCs | LCs | IDCs | PBMCs |
| NAbs | | | | | | |
| 447-52D | 6 | 3 | 150 | ND[b] | ND | NI[c] |
| 4E10 | 30 | 9 | 150 | 45 | 9 | 300 |
| IgG1 b12 | 9 | 9 | 25 | 6 | 6 | NI |
| 2G12 | 30 | 27 | 150 | 36 | 27 | NI |
| 2F5 | 24 | 21 | 90 | 30 | 30 | 150 |
| IgA b12 | 75 | 90 | 165 | ND | ND | ND |
| NNIAbs | | | | | | |
| 240D | 24 | 30 | NI | ND | ND | NI |
| 246D | 225 | 210 | NI | ND | ND | NI |
| NNNIAbs | | | | | | |
| 5F3 | NI | NI | NI | NI | NI | NI |
| 3D6 | NI | NI | NI | NI | NI | NI |

[a] $IC_{90}$, the concentration of Ab which resulted in a 90% reduction in the number of infected cells. Values are means from 4 to 7 independent experiments.
[b] ND, not done.
[c] NI, no inhibitory activity detected at 300 μM Ab.

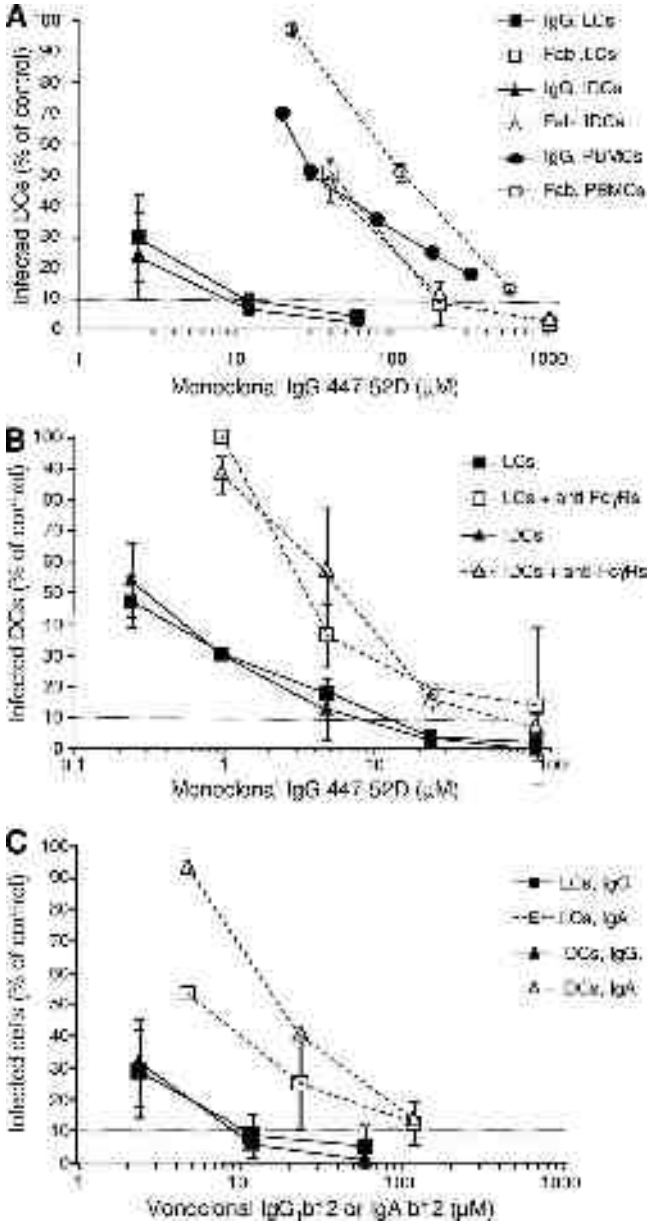



FIG. 4. Inhibition by NAb of HIV-$1_{BaL}$ replication in LCs and IDCs. Values correspond to the numbers of infected cells in the presence of various concentrations of Ab, calculated as percentages of the totals without Ab. (A) Inhibition of HIV-1 replication by monoclonal NAb 447-52D (whole IgG) and its corresponding Fab fragment on LCs, IDCs, and PBMCs. (B) Inhibition of HIV-1 replication by monoclonal NAb 447-52D with or without a 30-min preincubation of the cells with 10 μg/ml of each mouse monoclonal IgG directed against human FcγRI, FcγRII, and FcγRIII. (C) Inhibition of HIV-1 replication by neutralizing IgG1 b12 versus monomeric IgA b12. Data are representative of 3 to 5 independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

were unexpected, as these cells express different C-type lectin receptors (CLRs). LCs express langerin, reported to be involved in the degradation of HIV-1 particles (8). de Witte et al. showed that antilangerin Abs block HIV-1 degradation. Therefore, we anticipated that IDCs would be preferentially infected in our culture conditions, but the percentages of infection in LCs and IDCs were similar. To analyze the role of langerin, we performed competition experiments with three antilangerin antibodies. The antilangerin clone DCGM04, also used by de Witte's group, did not modify HIV-1 replication in LCs, as previously reported (8). However, the two other Abs tested (the monoclonal antilangerin Ab from another clone and polyclonal antilangerin Ab) also failed to increase HIV-1 replication in LCs. The lack of effect of these antilangerin Abs on HIV-1 replication may be because those described by de Witte et al. as able to block HIV-1 degradation in LCs recognize a very specific epitope, distinct from that recognized by our commercial Abs. Another possibility is that the large amount of virus required to detect infection of these cells may overwhelm the inhibitory activity of langerin. This point is difficult to assess because using lower concentrations of virus did not allow detection of infected cells by flow cytometry after a single cycle of infection (not shown). Moreover, the origins of the DC populations used were different in these two studies (LCs derived from $CD34^+$ progenitors were used in our model, and skin-purified LCs were used by de Witte et al. [8]), and this may have consequences for the langerin inhibitory activity. Therefore, our results show (i) similar infection rates of LCs and IDCs and (ii) the absence of increased infection after langerin blockage. These results are not in accordance with the anti-HIV function of langerin proposed by van der Vlist and Geijtenbeek (36).

Note that the IDCs that are in coculture with LCs are different from MDDCs; in particular, expression of DC-SIGN was very weak. DC-SIGN efficiently binds HIV particles; this binding may favor close proximity between HIV and neighboring CD4 receptors and, in this way, trigger virus fusion (5). This may not happen on our IDCs, which lack this CLR. Nonetheless, IDCs were successfully infected under our coculture conditions.

The similarities in HIV-1 replication in LCs and IDCs allowed us to study the inhibitory activities of Abs in the cultures containing both DC subsets. We demonstrated for the first time that NAbs efficiently inhibit HIV-1 infection of LCs and IDCs. To determine the involvement of the Fc part of IgG in HIV inhibition, we compared the activity of whole IgG 447-52D to that of its corresponding Fab fragments by using PBMCs and LCs/IDCs. When CD4 T cells were the targets, the inhibitory activity of Fab was about half that of whole IgG. As CD4 T lymphocytes do not express FcγR (whereas DC subsets do), this small difference in inhibitory activity of Fab can be attributed to the monovalent structure of Fab, compared to that of whole IgG. In contrast, when LCs and IDCs were used as targets instead of PBMCs, the inhibitory activity of the Fab was less than 1/10 that of the whole IgG, strongly implicating the Fc fragment in the inhibitory activity of IgGs. Thus, the lower inhibitory activity of Fab was due not only to fewer epitopes but also to an FcγR-dependent mechanism of inhibition. Also, the NNIAbs 240D and 246D inhibited infection of LCs and IDCs, confirming the existence of an FcγR-mediated inhibitory mechanism in these cell subtypes.

We previously showed that FcγRI was mainly involved on macrophages whereas FcγRII was mainly involved on MDDCs (17). The relative expression levels of FcγRI, FcγRII, and FcγRIII differ among LCs, IDCs, and MDDCs. Nevertheless, we found that NAbs and NNIAbs had very comparable HIV-1

inhibitory activities for these three types of DCs (17). The relative contribution of each of the different FcγRs needs to be assessed further. After binding to their cognate FcγRs, HIV-1 IgG immune complexes may undergo degradation. The activation pathways that lead to the degradation of opsonized viral particles remain obscure. Immune complexes may be responsible for the activation of phagocytosis followed by the degradation of the pathogen in macrophages or monocytes (7, 18). As phagocytosis is impaired when these cells are infected by HIV-1, HIV-1-specific IgG should be induced early before acute infection and at the site of virus entry to exploit the FcγR-dependent inhibition mechanism maximally (20).

The mucosal immune response is characterized by the induction of specific IgA. We studied the inhibitory activity of this Ab class against infection of LCs and IDCs. Neutralization with b12 Abs of the IgA type showed a potent inhibitory activity against HIV-1 replication in LCs and IDCs, but this activity was nevertheless lower than that for the corresponding IgG1. In our LCs and IDCs generated from cord blood, expression of FcαR at the surface was negligible. Our findings are in accordance with a report by Geissmann et al. (9) that shows the expression of FcαR only in a subpopulation of IDCs in the derma and not in LCs in the epidermis. Note that we also failed to detect any efficient FcαR-mediated inhibitory activity on monocyte-derived macrophages (MDMs) (15), which, unlike LCs, strongly express FcαR. FcγR-mediated inhibitory activity has been detected for human MDMs and MDDCs and now also for LCs and IDCs (15, 17). We propose that this mechanism may be common to all APCs bearing specific FcγRs. As a consequence, FcγR-mediated inhibition may have a physiological relevance for APCs present at the mucosal site by contribution to HIV-1 inhibition after sexual transmission. Overall, these results strongly suggest that induction, in the mucosa, of IgG type Abs in addition to IgA may be highly beneficial in protecting APCs from HIV infection, thereby limiting HIV transmission to the neighboring cells, particularly CD4 T lymphocytes.

The inhibitory activity of NNIAbs on APCs provides new opportunities to induce Abs able to recognize "nonneutralizing" epitopes, in addition to NAbs. As the epitopes recognized by the NNIAbs 246D and 240D are both well conserved and very immunogenic, the design of immunogens able to induce such Abs should be feasible. To date, most assays used to measure Abs induced by vaccination involve PBMCs or T cell lines. Consequently, the presence of nonneutralizing IgGs after vaccination may have been missed. We therefore propose extending neutralization assays to other cell types, notably macrophages and DCs, which would allow the identification of these NNIAbs. In addition, optimization of the design of the Fc part of IgGs for their FcγRs should be considered (30).

By using Fc mutated IgGs, Hessell et al. revealed the importance of the Fc part of IgGs in protection against SHIV infection in a macaque model of experimental challenge by the vaginal route (11, 12). Our results support the importance of FcγR-mediated inhibition of HIV-1 infection of numerous target cells present at mucosal sites. Further characterization of the type of humoral immune response that should be induced in the mucosa to protect from HIV sexual infection will potentially be very valuable.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Laumond, A. Proust, and J. Penichon for technical assistance and R. El Habib for fruitful discussions.

This work was supported by funds from EuroNeut 41 (FP7-HELTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Dormeur Investment Services Ltd., and ANRS. M.P. and X.K. were supported by scholarships from Sidaction and from EuroPrise, respectively.

We declare no competing interests.

## REFERENCES

1. **Baba, T. W., et al.** 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. Nat. Med. **6:**200–206.
2. **Banchereau, J., and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature **392:**245–252.
3. **Binley, J. M., et al.** 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. J. Virol. **78:**13232–13252.
4. **Broliden, K., A. T. Haase, S. K. Ahuja, G. M. Shearer, and J. Andersson.** 2009. Introduction: back to basics: mucosal immunity and novel HIV vaccine concepts. J. Intern. Med. **265:**5–17.
5. **Burleigh, L., et al.** 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. J. Virol. **80:**2949–2957.
6. **Caux, C., et al.** 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. J. Exp. Med. **184:**695–706.
7. **David, A., et al.** 2006. The engagement of activating FcgammaRs inhibits primate lentivirus replication in human macrophages. J. Immunol. **177:**6291–6300.
8. **de Witte, L., et al.** 2007. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. Nat. Med. **13:**367–371.
9. **Geissmann, F., et al.** 2001. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. J. Immunol. **166:**346–352.
10. **Goujon, C., et al.** 2007. SIVSM/HIV-2 Vpx proteins promote retroviral escape from a proteasome-dependent restriction pathway present in human dendritic cells. Retrovirology **4:**2.
11. **Hessell, A. J., et al.** 2007. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature **449:**101–104.
12. **Hessell, A. J., et al.** 2009. Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. Nat. Med. **15:**951–954.
13. **Hirbod, T., et al.** 2009. Abundant and superficial expression of C-type lectin receptors in ectocervix of women at risk of HIV infection. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. **51:**239–247.
14. **Hladik, F., et al.** 2007. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. Immunity **26:**257–270.
15. **Holl, V., et al.** 2004. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. J. Immunol. **173:**6274–6283.
16. **Holl, V., et al.** 2006. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. J. Virol. **80:**6177–6181.
17. **Holl, V., et al.** 2006. Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. Blood **107:**4466–4474.
18. **Huber, V. C., J. M. Lynch, D. J. Bucher, J. Le, and D. W. Metzger.** 2001. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. J. Immunol. **166:**7381–7388.
19. **Kawamura, T., et al.** 2008. Significant virus replication in Langerhans cells following application of HIV to abraded skin: relevance to occupational transmission of HIV. J. Immunol. **180:**3297–3304.
20. **Kedzierska, K., et al.** 2003. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. J. Clin. Virol. **26:**247–263.
21. **Mantis, N. J., et al.** 2007. Inhibition of HIV-1 infectivity and epithelial cell transfer by human monoclonal IgG and IgA antibodies carrying the b12 V region. J. Immunol. **179:**3144–3152.
22. **Mascola, J. R.** 2004. Neutralizing antibody quantification by flow cytometry. Methods Cell Biol. **75:**709–716.
23. **Mascola, J. R., et al.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. J. Virol. **76:**4810–4821.
24. **Miller, C. J., and R. J. Shattock.** 2003. Target cells in vaginal HIV transmission. Microbes Infect. **5:**59–67.
25. **Piguet, V., and R. M. Steinman.** 2007. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. Trends Immunol. **28:**503–510.
26. **Polonis, V. R., et al.** 2008. Recent advances in the characterization of HIV-1

neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. Virology **375:**315–320.
27. **Relloso, M., et al.** 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. J. Immunol. **168:**2634–2643.
28. **Reynolds, M. R., et al.** 2010. Macaques vaccinated with SIVmac239Δnef delay acquisition and control replication after repeated low-dose heterologous SIV challenge. J. Virol. **84:**9190–9199.
29. **Rozis, G., A. Benlahrech, S. Duraisingham, F. Gotch, and S. Patterson.** 2008. Human Langerhans' cells and dermal-type dendritic cells generated from CD34 stem cells express different Toll-like receptors and secrete different cytokines in response to Toll-like receptor ligands. Immunology **124:**329–338.
30. **Siberil, S., C. A. Dutertre, W. H. Fridman, and J. L. Teillaud.** 2007. FcgammaR: the key to optimize therapeutic antibodies? Crit. Rev. Oncol. Hematol. **62:**26–33.
31. **Smed-Sorensen, A., et al.** 2005. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. J. Virol. **79:**8861–8869.
32. **Srivastava, I. K., J. B. Ulmer, and S. W. Barnett.** 2005. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. Hum. Vaccin. **1:**45–60.
33. **Turville, S. G., M. Aravantinou, H. Stossel, N. Romani, and M. Robbiani.** 2008. Resolution of de novo HIV production and trafficking in immature dendritic cells. Nat. Methods **5:**75–85.
34. **Valladeau, J., et al.** 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity **12:**71–81.
35. **Valladeau, J., and S. Saeland.** 2005. Cutaneous dendritic cells. Semin. Immunol. **17:**273–283.
36. **van der Vlist, M., and T. B. Geijtenbeek.** 2010. Langerin functions as an antiviral receptor on Langerhans cells. Immunol. Cell Biol. **88:**410–415.
37. **Walker, L. M., et al.** 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. Science **326:**285–289.
38. **Wu, X., et al.** 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. Science **329:**856–861.
39. **Xu, J. Y., M. K. Gorny, T. Palker, S. Karwowska, and S. Zolla-Pazner.** 1991. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. J. Virol. **65:**4832–4838.

# Manuscrit 3

# Les anticorps neutralisants inhibent le transfert du VIH-1 des cellules dendritiques primaires aux lymphocytes T CD4 autologues.

Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes.

Bin Su, Ke Xu, Alexandre Lederle, Maryse Peressin, Marina Elizabeth Biedma, Géraldine Laumond, Sylvie Schmidt, Thomas Decoville, Alizé Proust, Mélanie Lambotin, Vincent Holl and Christiane Moog.

*Publication en révision, Blood, 2012.*

Les travaux précédents ont permis de montrer une augmentation du pourcentage d'infection des MoDC en présence de lymphocytes T CD4, ainsi que l'inhibition du transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4 par l'AcN b12. L'étude suivante propose de s'intéresser précisément au mécanisme d'inhibition du transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4.

Dans ces conditions de transfert, des AcN dirigés contre des épitopes de la gp120 et la gp41 ont inhibé le transfert en *cis* et en *trans* du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4. Néanmoins les AcNNI n'ont pas démontré d'activité inhibitrice sur l'infection des lymphocytes T CD4. De manière surprenante, bien qu'ils aient été ajoutés deux heures après l'infection, les AcN et certains AcNNI ont inhibé l'infection des MoDC. Cette inhibition de l'infection des MoDC est corrélée avec la maturation des cellules.

Cette étude confirme que les AcN sont capables d'inhiber le transfert en *cis* et en *trans* du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4. Les résultats suggèrent que la fixation des AcN et des AcNNI sur les RFcγ présents à la surface des MoDC déclenchent la maturation des cellules entraiant l'inhibition de la réplication du VIH-1.

**Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes.**

Bin Su[1], Ke Xu[1,2], Alexandre Lederle[1], Maryse Peressin[1], Marina Elizabeth Biedma[1], Géraldine Laumond[1], Sylvie Schmidt[1], Thomas Decoville[1], Alizé Proust[1], Mélanie Lambotin[1], Vincent Holl[1,3*] and Christiane Moog[1*]

[1] UMR_S 748, Institut National de la Santé et de la Recherche Médical (INSERM), Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

[2] Current address: State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, 100 Yingxin Street, Xuanwu District, Beijing 100052, China

[3] Current address: Lab Science Department, Hematology and Flow Department, Covance CLS SA, 7 Rue Moise-Marcinhes, CH-1217 Meyrin, Geneva, Switzerland

[*] **Corresponding authors:**

Dr. Vincent Holl
Lab Science Department,
Hematology and Flow Department,
Covance CLS SA, 7 Rue Moise-Marcinhes,
CH-1217 Meyrin, Geneva, Switzerland
Tel. +41 (0)22-989-7391
e-mail: vincent.holl@covance.com

Dr. Christiane Moog
INSERM U748, Institut de Virologie, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg
3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France
Tel. +33 (0)368853742
Fax. +33 (0)368853724
e-mail: c.moog@unistra.fr

**Running Title:** Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer

**Type of Article:** Regular Article

**Scientific category:** Immunobiology

**Manuscript length:** Text words: 4744; Abstract words: 196; Number of tables: 1; Number of figures: 7; Number of references: 50; Number of supplemental figures: 3

**Keywords:** HIV-1 transfer, dendritic cells, primary lymphocytes, neutralizing and non-neutralizing antibodies, maturation, FcγRs

**Abbreviations used:** HIV-1, human immunodeficiency virus-1; AZT, azidothymidine; IDV, protease inhibitor Indinavir; DCs, dendritic cells; MoDCs, monocyte-derived dendritic cells; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; $IC_{70}$, inhibitory concentration 70; Abs, antibodies; NAbs, neutralizing antibodies; NNAbs, non-neutralizing antibodies

**Abstract**

**Although dendritic cells (DCs) support poor HIV-1 replication, they have been shown to very efficiently transfer infectious viral particles to neighboring permissive CD4 T lymphocytes. This mode of cell-to-cell HIV-1 spread has been proposed to be a predominant mode of infection and dissemination. Here we analyzed, in HIV-1 transfer conditions, the kinetics of fusion, replication and the ability of HIV-1 specific antibodies to inhibit HIV-1 transfer from immature DCs to autologous CD4 T lymphocytes. We found that neutralizing monoclonal antibodies, but not non-neutralizing antibodies, were able to prevent HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes in *trans* and in *cis*. Moreover, a significant decrease of HIV-1 replication in DCs was observed, although neutralizing antibodies were added two hours after HIV-1 infection. Interestingly, this HIV-1 inhibition in DCs was detected with some non-neutralizing antibodies and was correlated with DCs maturation. We propose that the binding of HIV-1 specific antibodies to FcγRs participate in the mechanism of HIV-1 inhibition in DCs by triggering their maturation. The efficient inhibition of HIV-1 transfer strengthen the requirement of the induction, by vaccination, of HIV-1 specific antibodies directly at mucosal portal of HIV-1 entry in order to prevent early dissemination after sexual transmission.**

## Introduction

Sexual mucosal transmission is the main route of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection worldwide.[1] HIV-1 infection occurs *via* genital mucosal tissues, but cellular mechanisms leading to HIV-1 infection are not well defined. The mucosal tissues contain various types of immune cells, and particularly dendritic cells (DCs) which have been shown to be among the first HIV-1 target cells.[2-4] DCs are antigen-presenting cells lining the genital mucosa that activate antigen-specific cells to initiate a potent immune response.[5] HIV-1 can subvert antigen processing in DCs resulting in viral uptake, infection and transfer.

Several studies have shown that different types of DCs are infected by HIV-1 *in vivo*, in the SIV-infected macaque model[6,7] or *ex vivo* in vaginal epithelial explants.[3] *In vitro*, immature DCs replicate CCR5-tropic virus although less efficiently than primary CD4 T lymphocytes.[8-10] In addition, interactions between DCs and HIV-1 have highlighted an important role for DCs in HIV-1 transmission. Efficient transfer of HIV-1 from DCs to CD4 T lymphocytes has been described since 1992.[11] This cell-to-cell spread of HIV-1 may largely contribute to HIV-1 propagation and dissemination through the body,[11-17] but the exact mechanisms leading to HIV-1 transfer are still under investigation.[18,19] DCs bound native free viral particles, however viruses are rarely co-localized with endolysosomal markers suggesting that endolysosomal trafficking is altered.[20]

Two modes of HIV-1 transfer have been well described: *trans*-infection and *cis*-infection.[20-22] Infectious viral particles within intracellular compartments in DCs can be rapidly redirected to virological synapses formed at the contact between infected DCs and CD4 T lymphocytes.[12,20,21,23,24] This *trans*-infection might also be mediated by DC-derived exosomes released from immature MoDCs.[25] Others have shown that HIV-1 bound to C-type lectins such as DC-SIGN on the cell surface of immature DCs can be efficiently captured and transferred straightly to CD4 T lymphocytes during cell-to-cell contact with the infected DCs.[13,18,26,27] This HIV-1 transfer referred to *trans*-infection occurs in the absence of viral replication in DCs.[13] This *trans*-infection of CD4 T lymphocytes was demonstrated to be transient as HIV-1 transfer decayed within the first 24 hours,[20] depending of the time of CD4 T lymphocytes addition to infected DCs.[28] Subsequently, a second transfer phase was

detected in immature DCs after 48 hours as an AZT-sensitive rise in proviral DNA.[20] This second long-term transfer referred to transfer in *cis* occurs after conventional HIV-1 fusion and *de novo* virus production in immature DCs.[20] Consequently, the mechanism of viral transfer from DCs to CD4 T lymphocytes can be addressed as a function of time: early addition of CD4 T lymphocytes to HIV-1 exposed DCs may allow the analysis of HIV-1 transfer in *trans*, whereas addition of CD4 T lymphocytes one day after DC infection will promote transfer in *cis*.

Previous studies suggested that the transfer of viral particles from MoDCs to CD4 T lymphocytes was resistant to neutralizing antibodies (NAbs).[9,27] Authors therefore proposed that virological synapse between infected DCs and CD4 T lymphocytes may impede the binding of NAbs to the transferred virus.[9] In contrary, others found that HIV-1 transfer was sensitive to NAbs.[19,29,30] We previously showed that HIV-1 exposed immature MoDCs became high producers of new synthesized viral particles when they were co-cultured with primary CD4 T lymphocytes.[28] The HIV-1 produced by DCs and released into the supernatant may interfere with the inhibition of HIV-1 transfer to T cells by Abs: Abs being able to inhibit HIV-1 transfer to T cells but not HIV-1 production in DCs. This would result in HIV-1 release in the supernatant despite efficient inhibition of HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes. Therefore, in order to discriminate virus produced by DCs from virus transferred to CD4 T lymphocytes, we analyzed intracellular p24 of HIV-1 produced in DCs and in CD4 T lymphocytes directly instead of HIV-1 released into the supernatant. We found that NAbs, when added together with CD4 T lymphocytes on HIV-1 loaded DCs strongly inhibited HIV-1 *trans*-infection of primary CD4 T lymphocytes, whereas non-neutralizing antibodies (NNAbs) had no inhibitory activity. Surprisingly, neutralizing as well as some NNAbs were able to decrease the percentage of infected MoDCs in the co-culture, and this decrease was correlated with the level of DCs maturation.

## Material and Methods

### Antibodies

Mouse monoclonal antibodies (Abs) against human CD3-VioBlue (BW264/56), CD83-APC (HB15) were purchased from Miltenyi Biotec SAS (France). PerCP-Cy5.5 Mouse monoclonal Abs anti-Human CD209 (DC-SIGN, DCN46) was purchased from BD Pharmigen™ (San Diego, CA). HIV-1 antigen p24 KC57-FITC (FH190-1-1) and Goat $F(ab')_2$ Fragment anti-Human IgG (Fcγ)-PE were purchased from Beckman-Coulter (Roissy, France). NAbs $IgG_1$2G12 (directed against gp120), 2F5 and 4E10 (against gp41) were obtained from Polymun Scientific, Inc. (Vienna, Austria). Monoclonal Abs directed against CD4 binding site, NAb $IgG_1$b12 and NNAb $IgG_1$b6 were kindly provided by D. Burton and NAbs VRC01, VRC03 by J. R. Mascola. Inhibitory monoclonal $IgG_1$246-D and 4B3 (against gp41) were kindly provided by S. Zolla-Pazner and Polymun, respectively. NNAbs $IgG_1$1570-D (NIH 1172, against CD4 binding site) and $IgG_1$5F3 (NIH 6882, against gp41) were obtained through the NIH. Monoclonal anti-Dengue Antibody (DEN-3) was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH.

### Cell preparation

All human blood samples were collected from HIV-1 and HCV seronegative donors (EFS, Strasbourg). MoDCs were obtained by differentiation of purified human blood $CD14^+$ monocytes using immunomagnetic bead isolation after Ficoll-Hypaque sedimentation (AutoMACS; Miltenyi Biotec). Autologous CD4 T lymphocytes were purified by positive selection after CD14 purification. The purified $CD14^+$ monocytes were differentiated into MoDCs by addition of 10 ng/mL Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF; R&D systems, Minneapolis, MN) and 20 ng/mL IL-4 (R&D systems) as previously described.[28,31,32] Primary purified CD4 T lymphocytes were activated with Phytohemaglutinine-A (PHA) (1 µg per million of cells, 1 mg/mL) for 3 days. Cells were frozen and thawed one day before use as described.[28]

**Virus preparation**

Primary HIV-1 isolates were amplified on human blood leukocytes as previously described.[31] Virus stocks were collected at the peak of virus production and concentrated 80-fold using a 100-kDa cutoff polyethersulfone filter (Centricon 80 Plus Biomax Filter, Millipore, Molsheim, France). Primary R5 HIV-$1_{BaL}$ (subtype B) was provided by S. Gartner, M. Popovic and R. Gallo from the National Institutes of Health (NIH). HIV-$1_{TV1}$ (subtype C, R5 strain) was obtained from S. Engelbrecht. HIV-$1_{QH0}$ (subtype B, R5 strain) was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

**HIV-1 transfer experiments**

The conditions used for MoDCs infection and co-culture with PHA-activated autologous CD4 T lymphocytes were similar to those previously described.[28] Briefly, immature MoDCs were infected with primary R5 HIV-1 at a concentration of 500 ng/mL viral p24 antigen. After two hours of incubation, cells were extensively washed to remove unbound free viral particles. Cells were re-suspended at $6x10^6$ cells/mL and 25 µL of HIV-1-loaded MoDCs were incubated with 25 µL of PHA-activated CD4 T lymphocytes (at concentration of $24x10^6$ cells/mL) and 25 µL of human monoclonal Abs at different concentrations in 96-wells plates. When indicated, 5 µM of Azidothymidine (AZT, Sigma), a reverse transcriptase inhibitor, was added two hours after MoDCs infection, concomitantly to CD4 T lymphocytes addition to prevent HIV-1 replication. Viral p24 antigen detected in AZT treated wells were therefore indicative of residual p24 detected in the absence of *de novo* virus synthesis. Unless otherwise stated, productive infection was quantified by flow cytometry by detection of intracellular viral p24 antigen in both cell populations after 48 hours of culture. The inhibitory concentration $IC_{70}$ (concentration of antibody resulting in a 70% reduction of the percentage of infected cells) was measured in parallel for HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes and for HIV-1 replication in MoDCs.

**Kinetics measurement of HIV-1 fusion, replication and single cycle of HIV-1 infection in co-cultured MoDCs and CD4 T lymphocytes**

To study the kinetics of HIV-1 fusion and replication in MoDCs and primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes, HIV-1 fusion inhibitor Fuzeon (T20) (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) or HIV-1 reverse transcriptase inhibitor Azidothymidine (AZT) were added at 5 µg/mL and 5 µM respectively at different time post-infection. HIV-1 protease inhibitor Indinavir (IDV) (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) added at 1 µM[33] to MoDCs at the same time as CD4 T lymphocytes, allows analysis of a single cycle of HIV-1 replication.

**Antibody neutralizing activity on purified CD4 T lymphocytes**

Antibody neutralization was assessed as previously described.[34] Briefly, 25 µL of purified primary HIV-$1_{BaL}$ isolate (concentration of 500 ng/mL viral p24 antigen to allow >2% infected cells) was pre-incubated for 1 hour with 25 µL of human monoclonal Abs before the addition of 25 µL of PHA-stimulated CD4 T lymphocytes at $15x10^6$ cells/mL. After 48 hours, the percentage of infected CD4 T lymphocytes was determined by detection of intracellular p24 viral antigen by flow cytometry. $IC_{70}$ neutralizing antibody titers were determined as the concentration of antibody which resulted in a 70% reduction of infected cells.

**Cell staining and flow cytometry assay**

Briefly, cells were labeled with Live/Dead Fixable Dead Cell Stain fluorescence Kits (Invitrogen Life Science, Applied Biosystems Inc. California, USA) for 10 minutes at room temperature. After washing, Abs directed against human CD209 (DC-SIGN), CD83 and CD3 cell surface molecules were added for 10 minutes at 4°C. Cells were fixed and permeabilized using the Cytofix and Perm/Wash kit solutions (BD Biosciences), followed by intracellular p24 antigen staining. The percentage of infected cells in each cell population was analyzed by flow cytometry. Acquisition of multi-color samples was performed with a LSRII SORP cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA). Cytometer setup and tracking (CST) calibration particles were used to ensure consistency of fluorescence intensity

measurement throughout all experiments. Compensation was performed using a flow cytometry CompBeads kit (BD). Forward angle and side scatter light gating were used to exclude cell debris from the analysis. Forward width and forward area were used to exclude doublet cells, and dead cells were excluded by using the Live/Dead Kit solution. The final analysis and graphical output were performed using FACS Diva software version 6.1.2 (BD).

**Antibody-binding detection assay**

Cells were incubated with 100 µg/mL of different anti-HIV-1 specific Abs for 10 min at 4°C, washed with PBS, and incubated for 10 min at 4°C with Goat $F(ab')_2$ Fragment anti-Human IgG (Fcγ)-PE (Beckman-Coulter). Cells were washed and fixed using Cytofix solution. Samples were acquired on the LSRII SORP cytometer and analyzed using FACS Diva software. To determine whether the Fc portions of human monoclonal Abs bind to the FcγRs on the surface of MoDCs, FcγRs were blocked by incubation of MoDCs with a mixture of purified anti-FcγRI (CD64, clone 10.1), anti-FcγRII (CD32, clone 3D3) and anti-FcγRIII (CD16, clone 3G8) Abs (BD Pharmingen™) at 10 µg/mL for 30 min at 4°C before addition of anti-HIV-1 specific Abs.

**Enzyme-linked immunosorbent assay**

HIV-1 p24 antigen released into the supernatant of co-cultured cell populations was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Innogenetics/Ingen) following manufacturer's instruction.

**Statistical analysis**

Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test), and pairwise comparisons were made using *t* tests (Mann Whitney test). Values of $p<0.05$ were considered to be statistically significant. Correlations were analyzed using Pearson's correlation coefficient, and significance was set at $p<0.05$. All statistical calculations were performed using GraphPad Prism 5.04 software (GraphPad, San Diego, California, USA).

## Results

### Productive HIV-1 infection of MoDCs and CD4 T lymphocytes

We selected HIV-1 transfer conditions allowing the assessment of the early stage of HIV-1 transfer in *trans* from MoDCs to CD4 T lymphocytes (Figure 1). For these transfer conditions, PHA-activated CD4 T lymphocytes and anti-HIV-1 specific Abs were added after two hours on HIV-1-loaded immature MoDCs. Moreover, in order to restrain multiple cycles of reverse transcription leading to transfer in *cis,* we determined HIV-1 replication after 48 hours infection (Figure 1). At that time point, efficient HIV-1 transfer from MoDCs to PHA-activated CD4 T lymphocytes was detected (4.64% of $CD3^+$ T lymphocytes were p24 positive) (Figure 2A). In addition, immature MoDCs were found infected, as 5.23% were p24 positive (Figure 2A). This infection corresponds to newly synthesized virions, because in the presence of the reverse transcriptase inhibitor AZT, there were no detectable p24 positive cells (Figure 2A). Noteworthy, in the absence of CD4 T cells, only few (0.61%) immature DC-$SIGN^+$ MoDCs replicate HIV-1 after 48 hours (Figure 2A).

Efficient HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes was repeatedly observed (n=38). Interestingly, the percentages of HIV-1 replication in CD4 T lymphocytes and MoDCs were correlated (Figure 2B), suggesting a strong cooperation between MoDCs and CD4 T lymphocytes to promote HIV-1 replication in both cell type.

### Kinetics of HIV-1 fusion and replication in MoDCs and autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes

To analyze the kinetics of HIV-1 membrane fusion in co-culture conditions, a fusion inhibitor T20 was added at different time points post-infection (Figure 3A). When T20 was added to HIV-1-loaded MoDCs at the same time as CD4 T lymphocytes, about 20% of MoDCs were found positive for intracellular p24 antigen after 48 hours. This result indicates that more than 80% of HIV-1 has not yet fused with immature MoDCs after 2 hours incubation (Figure 3A) and could still be accessible to various anti-HIV-1 specific Abs. Moreover, at this time point, T20 almost completely inhibited HIV-1

transfer to primary CD4 T lymphocytes, showing that fusion is required for HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes as previously described (Figure 3A).[35,36]

The kinetics of HIV-1 reverse transcription was determined by adding the reverse transcriptase inhibitor AZT at different time points post-infection. We found a similar profile of the reverse transcription in MoDCs and CD4 T lymphocytes in co-culture (Figure 3B). Indeed, in these co-culture conditions 40% of MoDCs were already infected compared to control when AZT was added 20 hours post-infection. These results demonstrate that in MoDCs co-cultured with CD4 T lymphocytes, the reverse transcription occurs more rapidly than in MoDCs alone. In fact, in the absence of CD4 T lymphocytes, MoDCs required about 48 hours for the reverse transcription to occur and 72 hours to detect the first round of viral replication (data not shown).[28,31] The accelerated reverse transcription observed in MoDCs during co-culture with CD4 T lymphocytes may account for the increased percentage of HIV-1 p24-positive MoDCs.

**Single cycle of HIV-1 infection in MoDCs and CD4 T lymphocytes in the co-culture**

To determine whether HIV-1 replication in MoDCs and CD4 T lymphocytes corresponds to a single cycle of HIV-1 infection after 48 hours incubation, a protease inhibitor Indinavir (IDV) was added to prevent the final assembly and maturation of newly synthesized virions and avoid any new cycle of infection. In the presence of this protease inhibitor, 82 % of MoDCs were found infected (Figure 3C), indicating that 48 hours of culture allows mainly a single cycle of HIV-1 replication in MoDCs and that during this time frame new infection of DCs did not yet occur. Therefore, under these conditions, HIV-1 transfer from DCs to CD4 T lymphocytes corresponds to the transfer in *trans* to CD4 T lymphocytes and not to a transfer of virus produced in *cis* by MoDCs. On contrary, about half of the lymphocyte population was detected positive for intracellular p24 antigen production in the presence of IDV (Figure 3C), indicative of a new cycle of HIV-1 replication in the CD4 T lymphocytes. Therefore, the HIV-1 replication detected in CD4 T lymphocytes corresponded to approximately half of the HIV-1 transfer in *trans* from MoDCs and to half of the HIV-1 infection of new viruses certainly produced by CD4 T lymphocytes. Noteworthy, 24 hours of co-culture was inadequate to record p24 of

HIV-1 infected MoDCs and CD4 T lymphocytes by flow cytometry (data not shown). Therefore, the 48 hours of incubation was chosen for the analysis of antibody inhibition of HIV-1 transfer in *trans*.

**Antibody-mediated inhibition of HIV-1 transfer**

The inhibitory activity of Abs in HIV-1 transfer from immature DCs to CD4 T lymphocytes was analyzed using a panel of anti-HIV-1 specific Abs at different concentrations (Table 1 and Figure 4). Their $IC_{70}$ were calculated and reported in Table 1. We found that six NAbs (anti-gp120 2G12, b12, VRC01, VRC03 and anti-gp41 2F5 and 4E10) efficiently prevented HIV-1 transfer from MoDCs to PHA-activated CD4 T lymphocytes (Table 1 and Figure 4A, 4B). These NAbs had an $IC_{70}$ comprises between 5 and 50 µg/mL on HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes (Table 1), whereas the five NNAbs, $IgG_1$ b6, 5F3 and 1570-D as well as the NNAbs Fcγ-mediated inhibitory Abs 246-D and 4B3, were not able to inhibit HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes (Table 1 and Figure 4C, 4D). In order to verify that NAbs inhibit HIV-1 transfer in *trans* to CD4 T cells, the protease inhibitor IDV was added to the co-culture. Similar inhibitory efficiency was observed in the presence of IDV (supplemental Figure S1C and S1D), demonstrating the capacity of NAbs to inhibit *trans*-infection. Moreover, this inhibition was maintained after 5 days of culture indicating a subsequent inhibition of transfer in *cis* by Abs (data not shown). This inhibition of HIV-1 transfer by Abs was observed following the infection of MoDCs with subtype C HIV-$1_{TV1}$ and subtype B HIV-$1_{QH0}$ in addition to HIV-$1_{BaL}$ (data not shown).

Besides the inhibition of HIV-1 transfer, NAbs also inhibited MoDCs infection in this co-culture condition despite the fact that HIV-1 was loaded to MoDCs 2 hours prior to the addition of Abs (Table 1, Figure 4A, 4B and supplemental Figure S1A, S1B). Moreover, a slightly decreased HIV-1 replication in MoDCs was detected in the presence of two NNAbs b6 and 246-D (Table 1 and Figure 4C, 4D), although no inhibition of HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes was found. Interestingly, for the NAbs directed against the gp120, the inhibition of HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes was more efficient than the inhibition of HIV-1 replication in MoDCs (Table 1, Figure 4A and supplemental Figure S1A, S1C). Inversely, for the anti-gp41 NAbs and two NNAbs b6 and 246-D, a more important inhibition of HIV-1 replication was observed in MoDCs compared to

HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes (Table 1, Figure 4B, 4C, 4D and supplemental Figure S1B, S1D). These differences were observed repeatedly from 3 to 4 independent experiments suggesting that functions of Abs depend on the epitope recognized. The inhibition of HIV-1 infected cells had a similar profile as the curve of p24 released into the supernatant, demonstrating that NAbs also prevent HIV-1 release into the supernatant (Figure 4A and 4B). The level of viral p24 antigen released into the supernatant was also decreased by about 50 % in the presence of the NNAbs b6 and 246-D (Figure 4C and 4D). Altogether, our results demonstrate that NAbs not only efficiently inhibit HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes in *trans* and in *cis* , but also decrease the infection of MoDCs.

**IgG-mediated inhibition of HIV-1 replication in MoDCs correlates with their maturation status**

As susceptibility to HIV-1 R5 infection is reduced following DC maturation,[37] we determined the capacity of Abs to induce MoDCs maturation. We measured the expression of DCs maturation marker CD83 on the surface of infected MoDCs in the co-culture at different concentrations of Abs compared to control (Table 1 and supplemental Figure S2). All NAbs induced MoDCs maturation except 2G12. Anti-gp41 Abs 2F5 and 4E10 induced high percentage of mature MoDCs (53% and 45% respectively, Table 1 and supplemental Figure S2). Moreover, the NNAbs 246-D, b6 and 5F3, but not 4B3 and 1570-D also induced MoDCs maturation (Table 1 and supplemental Figure S2). This increased DCs maturation was inversely correlated with the relative percentage of infected MoDCs (Table 1 and Figure 5). MoDCs infection did not induce MoDCs maturation in the absence of CD4 T lymphocytes, and the antibody 4E10 alone had minimal effect on the maturation process (Figure 6). Efficient MoDCs maturation was detected in the context of co-culture with CD4 T lymphocytes in the presence of HIV-1 neutralizing antibody 4E10, independently of viral replication ($p>0.05$, t-test) (Figure 6). MoDCs maturation was antibody-dependent, as no maturation was detected with either the NAb 2G12 nor the NNAbs 4B3 and 1570-D (Table 1). In addition, no MoDCs maturation was observed following incubation with purified polyclonal IgG from HIV-infected or HIV-negative individuals or with monoclonal anti-Dengue antibody (DEN-3) (data not shown).

**Binding of antibodies to FcγRs on MoDCs**

In previous studies, we have shown that Fcγ Receptors (FcγRs) are strongly implicated in the mechanism of HIV-1 inhibition in MoDCs by NAbs and NNAbs.[31,32] To investigate the mechanism of MoDCs maturation by anti-HIV-1 specific Abs, we analyzed their capacity to bind FcγRs present at the surface of MoDCs. We observed that NAbs 4E10 and 2F5 are efficiently bound at the surface of MoDCs with about 75% of MoDCs positive at 100 µg/mL of Abs (Figure 7). The two NNAbs 246-D and 4B3 were able to bind to MoDCs by 44% and 34%, respectively. To determine whether this binding was mediated by the Fc portions of these IgGs, FcγRs were blocked by incubation of MoDC with a mixture of Abs directed against FcγRI, FcγRII and FcγRIII before the addition of anti-HIV-1 specific Abs. The binding of the two NNAbs 246-D and 4B3 to MoDCs decreased significantly to 17% and 10% respectively after blockade of FcγRs, but anti-FcγRs only slightly impacted the binding capacities of NAbs 4E10 and 2F5 to MoDCs (Figure 7). These results indicate that the NNAbs 246-D and 4B3 bind to the cells mainly *via* FcγRs, while NAbs 4E10 and 2F5 had capacity to bind to other ligands on the surface of MoDCs independently of FcγRs. This binding may participate in MoDCs maturation, and consequently decrease HIV-1 replication in MoDCs.

**Comparison of HIV-1 antibodies inhibition between cell-to-cell transfer and conventional neutralizing assays using free viral particles**

The efficacy of antibody inhibition on HIV-1 transfer from MoDCs to CD4 T lymphocytes was compared to antibody inhibition in a conventional neutralization assay using cell-free viral particles infecting CD4 T lymphocytes (supplemental Figure S3). All NAbs exhibited similar inhibition levels in these two assays; the $IC_{70}$ was not significantly different, except for b12. Noteworthy, since only few MoDCs were infected in the absence of CD4 T lymphocytes after 48 hours (Figure 2A), the inhibitory activity of Abs in MoDCs alone was not assessed. Overall, these results demonstrate that HIV-1 transferred from MoDCs to CD4 T lymphocytes is efficiently inhibited by NAbs.

**Discussion**

Immature DCs have been described to capture virus and efficiently transfer it to neighboring CD4 target cells through the formation of virological synapses (for review see Piguet V. and Steinman R.M.,[2] Cavrois M. *et al.*,[18] and Sattentau QJ[38]). This mode of cell-to-cell spread of HIV-1 has been proposed to be extremely efficient, allowing a rapid dissemination of the virus into the organism.[4] Therefore, it is crucial to define whether anti-HIV-1 specific Abs block HIV-1 transfer, especially the transfer in *trans* which is responsible for the initial transmission to CD4 T lymphocytes at mucosal site.

We therefore developed an HIV-1 transfer assay that analyzed early HIV-1 replication in immature MoDCs and CD4 T lymphocytes. Treatment with the protease inhibitor Indinavir demonstrated that 48 hours incubation corresponded to a single cycle of HIV-1 infection in MoDCs. Consequently, we used these conditions to assess the capacity of anti-HIV-1 specific Abs to inhibit HIV-1 transfer in *trans* to CD4 T lymphocytes. We demonstrated that NAbs were able to efficiently inhibit HIV-1 transfer in *trans* to CD4 T lymphocytes, and consequently, cell-to-cell spread of HIV is not protected from antibody inhibitory capacity. In fact, fluorescence microscopy and electron tomography have shown that the inhibitors can access preformed virological synapses, interfere with HIV-1 cell-to-cell infection and consequently HIV-1 bound at the surface of DCs remain accessible to neutralizing monoclonal Abs.[36] Moreover, the inhibitory activity of NAbs for HIV-1 transfer was of the same order of magnitude as that detected when free HIV-1 particles infect CD4 T lymphocytes (supplemental Figure S3) or when using more classical neutralization assays involving PBMCs.[31,32] In neutralizing conditions, PBMCs were first incubated with free virus particles, and then cultured at confluence. During this incubation phase, we can hypothesize that HIV-1 transfer from cell-to-cell occurs and anti-HIV-1 specific Abs would also need to inhibit this cell-to-cell transmission. This would explain the overall poor inhibitory activity of NAbs in conventional primary PBMCs assays compared to single cycle T cell line based neutralization assay.[39]

Several groups have previously studied the inhibition of HIV-1 transfer by Abs and described controversial results, some showing HIV-1 transfer to be resistant to entry inhibitors or NAbs[9,27,40-43,44] whereas other demonstrating an efficient inhibition of HIV-1 replication.[13,19,29,30,35,36,45] It is noteworthy that all these studies analyzed either the early step of viral entry or HIV-1 released into the supernatant, but none of them considered HIV-1 replication in immature MoDCs. In this study we demonstrate that immature MoDCs largely participate both in HIV-1 production and HIV-1 inhibition by Abs. An increased percentage of infected MoDCs in the presence of autologous activated CD4 T lymphocytes was repeatedly observed following 48 hours infection as previously described.[28] This increased HIV-1 replication in DCs following CD4 T lymphocytes interactions have an impact on the inhibitory activity of NAbs.

Very interestingly, we found that in addition to the inhibition of HIV-1 transfer to CD4 T lymphocytes, NAbs were able to diminish HIV-1 replication in MoDCs. In fact, by dissecting the early steps of HIV-1 replication in MoDCs during co-culture, we showed that more than 80% of the virus has not yet fused with immature MoDCs 2 hours after infection. This indicates that HIV-1 binds at the cell surface of MoDCs can still be accessible to anti-HIV-1 specific Abs. Moreover, Abs like NNAbs 246-D and b6 did not affect HIV-1 transfer from infected MoDCs to CD4 T lymphocytes, but significantly reduced the percentage of infected MoDCs. In this co-culture condition, the inhibition of HIV-1 replication in MoDCs was correlated with the expression of DCs maturation marker CD83. As FcγRs engagement in DCs induced maturation,[46] the capacity of antibody to bind receptors on the surface of DCs was assessed. We found an efficient binding of Abs to FcγRs, but NAbs 4E10 and 2F5 also bind to MoDCs independently of FcγRs. In fact, NAbs 2F5 and 4E10 have polyspecific autoantibody properties[47] and recognize other proteins such as phospholipids.[48] In addition, in the context of DCs-T cells cross-talk, HIV/Abs immune complexes have been shown to be more efficient than virus alone to trigger antigen presentation by DCs.[46] Abs may therefore display an additional mechanism leading to efficient induction of HIV-1 specific immune response. This activation would be highly valuable in the context of a protective vaccine, although it may lead to tolerance in the case of chronic infections. Overall, our experiments suggest that the inhibition of DCs infection observed with some Abs occurs by at least two distinct mechanisms: the neutralization of virus particles that are

still attached on the surface of MoDCs by the Fab part of the IgG and the maturation of MoDCs through IgG-FcγR or other antibody-cell interactions.

HIV-1 replication is highly restricted in DCs. SAMHD1 has been proposed to limit HIV-1 replication by decreasing deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) pools in myeloid cells.[49,50] Mature DCs have reduced susceptibility to R5 viral replication; the viral life cycle is blocked shortly after entry[8] and the level of APOBEC3G restriction factor is increased.[37] In our HIV-1 transfer experimental conditions, HIV-1 replication in DCs is highly modulated, increased when co-cultured with CD4 T lymphocytes and decreased by further addition of anti-HIV-1 specific Abs. The mechanisms involved in these modulations need further investigations as it may highly impact on HIV replication and dissemination *in vivo*.

Even though a very favorable HIV-1 replication in the condition of co-culture of immature MoDCs and primary CD4 T lymphocytes was found in this study, the well-known NAbs were able to efficiently inhibit HIV-1 transfer and replication. These results are extremely encouraging and strengthen the requirement of the induction, by vaccination, of such Abs directly at the mucosal site to prevent the early dissemination of HIV-1 after its sexual transmission. Moreover, although inefficient for the inhibition of HIV-1 transfer from DCs to CD4 T lymphocytes, some NNAbs significantly decreased HIV-1 replication in MoDCs suggesting that they could participate to HIV-1 protection.

**Acknowledgments**

We gratefully acknowledge the support of EuroNeut41 (FP7-HELTH-2007-A-201038), EuroPrise (LSHP-CT-2006-037611), Sidaction, Dormeur Investment Service Ltd., and ANRS grants. B.S. was supported by the EuroNeut41 grant, and K.X. has obtained a PhD scholarship from EuroPrise.

**Authorship Contributions**

B.S. and K.X. performed the experiments; B.S., M.P., A.L., V.H. and C.M. analyzed the data; B.S., A.L., M.E.B., G.L., S.S., T.D., A.P., M.L., V.H. and C.M. contributed reagents/materials/analysis tools; B.S., V.H. and C.M. conceived, designed the experiments and wrote the paper.

**Disclosure of Conflict of interest**

The authors declare no conflicting financial interests.

**References**


1. Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(1):25-34. Prepublished on 2004/03/26 as DOI 10.1038/nrmicro729.

2. Piguet V, Steinman RM. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol*. 2007;28(11):503-510. Prepublished on 2007/10/24 as DOI S1471-4906(07)00225-6 [pii] 10.1016/j.it.2007.07.010.

3. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*. 2007;26(2):257-270. Prepublished on 2007/02/20 as DOI S1074-7613(07)00134-3 [pii] 10.1016/j.immuni.2007.01.007.

4. Miller CJ, Shattock RJ. Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect*. 2003;5(1):59-67. Prepublished on 2003/02/21 as DOI S1286457902000564 [pii].

5. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252. Prepublished on 1998/04/01 as DOI 10.1038/32588.

6. Spira AI, Marx PA, Patterson BK, et al. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med*. 1996;183(1):215-225. Prepublished on 1996/01/01 as DOI.

7. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol*. 2000;74(13):6087-6095. Prepublished on 2000/06/14 as DOI.

8. Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol*. 1998;72(4):2733-2737. Prepublished on 1998/04/03 as DOI.

9. Ganesh L, Leung K, Lore K, et al. Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies. *J Virol*. 2004;78(21):11980-11987. Prepublished on 2004/10/14 as DOI 78/21/11980 [pii] 10.1128/JVI.78.21.11980-11987.2004.

10. Peressin M, Holl V, Schmidt S, et al. HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies. *J Virol*. 2011;85(2):1077-1085. Prepublished on 2010/11/19 as DOI JVI.01619-10 [pii] 10.1128/JVI.01619-10.

11. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*. 1992;257(5068):383-387. Prepublished on 1992/07/17 as DOI.

12. Piguet V, Sattentau Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest*. 2004;114(5):605-610. Prepublished on 2004/09/03 as DOI 10.1172/JCI22812.

13. Cavrois M, Neidleman J, Kreisberg JF, Greene WC. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog*. 2007;3(1):e4. Prepublished on 2007/01/24 as DOI 06-PLPA-RA-0382R2 [pii]10.1371/journal.ppat.0030004.

14. Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(11):815-826. Prepublished on 2008/10/17 as DOI nrmicro1972 [pii] 10.1038/nrmicro1972.

15. Felts RL, Narayan K, Estes JD, et al. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(30):13336-13341. Prepublished on 2010/07/14 as DOI 1003040107 [pii] 10.1073/pnas.1003040107.

16. Nikolic DS, Lehmann M, Felts R, et al. HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood*. 2011. Prepublished on 2011/05/13 as DOI blood-2010-09-305417 [pii] 10.1182/blood-2010-09-305417.

17. Moris A, Pajot A, Blanchet F, Guivel-Benhassine F, Salcedo M, Schwartz O. Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood*. 2006;108(5):1643-1651. Prepublished on 2006/05/06 as DOI blood-2006-02-006361 [pii] 10.1182/blood-2006-02-006361.

18. Cavrois M, Neidleman J, Greene WC. The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(6):e1000051. Prepublished on 2008/06/28 as DOI 10.1371/journal.ppat.1000051.

19. Yu HJ RM, McDonald D. HIV Traffics through a Specialized, Surface-Accessible Intracellular Compartment during trans-Infection of T Cells by Mature Dendritic Cells. *PLoS Pathogens*. 2008;4(8)(e1000134. doi:10.1371/journal.ppat.1000134).

20. Turville SG, Santos JJ, Frank I, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103(6):2170-2179. Prepublished on 2003/11/25 as DOI 10.1182/blood-2003-09-3129 2003-09-3129 [pii].

21. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):859-868. Prepublished on 2006/10/26 as DOI nri1960 [pii] 10.1038/nri1960.

22. McDonald D. Dendritic Cells and HIV-1 Trans-Infection. *Viruses*. 2010;2(8):1704-1717. Prepublished on 2010/08/01 as DOI 10.3390/v2081704 viruses-02-01704 [pii].

23. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*. 2003;300(5623):1295-1297. Prepublished on 2003/05/06 as DOI 10.1126/science.1084238 1084238 [pii].

24. Jolly C, Sattentau QJ. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic*. 2004;5(9):643-650. Prepublished on 2004/08/07 as DOI 10.1111/j.1600-0854.2004.00209.x TRA209 [pii].

25. Wiley RD, Gummuluru S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):738-743. Prepublished on 2006/01/13 as DOI 0507995103 [pii] 10.1073/pnas.0507995103.

26. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-597. Prepublished on 2000/03/18 as DOI S0092-8674(00)80694-7 [pii].

27. van Montfort T, Nabatov AA, Geijtenbeek TB, Pollakis G, Paxton WA. Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178(5):3177-3185. Prepublished on 2007/02/22 as DOI 178/5/3177 [pii].

28. Holl V, Xu K, Peressin M, et al. Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. *J Virol*. 2010;84(9):4172-4182. Prepublished on 2010/02/12 as DOI JVI.01567-09 [pii] 10.1128/JVI.01567-09.

29. Frankel SS, Steinman RM, Michael NL, et al. Neutralizing monoclonal antibodies block human immunodeficiency virus type 1 infection of dendritic cells and transmission to T cells. *J Virol*. 1998;72(12):9788-9794. Prepublished on 1998/11/13 as DOI.

30. Sagar M, Akiyama H, Etemad B, Ramirez N, Freitas I, Gummuluru S. Transmembrane Domain Membrane Proximal External Region but Not Surface Unit-Directed Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies Can Restrict Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Trans-infection. *J Infect Dis*. 2012. Prepublished on 2012/03/08 as DOI jis183 [pii] 10.1093/infdis/jis183.

31. Holl V, Peressin M, Schmidt S, et al. Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. *Blood*. 2006;107(11):4466-4474. Prepublished on 2006/02/14 as DOI 2005-08-3490 [pii] 10.1182/blood-2005-08-3490.

32. Holl V, Peressin M, Decoville T, et al. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J Virol*. 2006;80(12):6177-6181. Prepublished on 2006/05/30 as DOI 80/12/6177 [pii] 10.1128/JVI.02625-05.

33. Mascola JR, Louder MK, Winter C, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *J Virol*. 2002;76(10):4810-4821. Prepublished on 2002/04/23 as DOI.

34. Holl V, Hemmerter S, Burrer R, et al. Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2004;173(10):6274-6283. Prepublished on 2004/11/06 as DOI 173/10/6274 [pii].

35. Ketas TJ, Frank I, Klasse PJ, et al. Human immunodeficiency virus type 1 attachment, coreceptor, and fusion inhibitors are active against both direct and trans infection of primary cells. *J Virol*. 2003;77(4):2762-2767. Prepublished on 2003/01/29 as DOI.

36. Martin N, Welsch S, Jolly C, Briggs JA, Vaux D, Sattentau QJ. Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition. *J Virol*. 2010;84(7):3516-3527. Prepublished on 2010/01/22 as DOI JVI.02651-09 [pii] 10.1128/JVI.02651-09.

37. Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, et al. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2006;203(13):2887-2893. Prepublished on 2006/12/06 as DOI jem.20061519 [pii] 10.1084/jem.20061519.

38. Sattentau QJ. Cell-to-Cell Spread of Retroviruses. *Viruses*. 2010;2(6):1306-1321. Prepublished on 2010/06/01 as DOI 10.3390/v2061306 viruses-02-01306 [pii].

39. Fenyo EM, Heath A, Dispinseri S, et al. International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report. *PLoS One*. 2009;4(2):e4505. Prepublished on 2009/02/21 as DOI 10.1371/journal.pone.0004505.

40. Chen P, Hubner W, Spinelli MA, Chen BK. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol*. 2007;81(22):12582-12595. Prepublished on 2007/08/31 as DOI JVI.00381-07 [pii] 10.1128/JVI.00381-07.

41. Sanchez-Palomino S, Massanella M, Carrillo J, et al. A cell-to-cell HIV transfer assay identifies humoral responses with broad neutralization activity. *Vaccine*. 2011;29(32):5250-5259. Prepublished on 2011/05/26 as DOI S0264-410X(11)00726-2 [pii] 10.1016/j.vaccine.2011.05.016.

42. Hubner W, McNerney GP, Chen P, et al. Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science*. 2009;323(5922):1743-1747. Prepublished on 2009/03/28 as DOI 323/5922/1743 [pii] 10.1126/science.1167525.

43. Dale BM, McNerney GP, Thompson DL, et al. Cell-to-Cell Transfer of HIV-1 via Virological Synapses Leads to Endosomal Virion Maturation that Activates Viral Membrane Fusion. *Cell Host Microbe*. 2011;10(6):551-562. Prepublished on 2011/12/20 as DOI S1931-3128(11)00370-2 [pii] 10.1016/j.chom.2011.10.015.

44. Yee M, Konopka K, Balzarini J, Duzgunes N. Inhibition of HIV-1 Env-Mediated Cell-Cell Fusion by Lectins, Peptide T-20, and Neutralizing Antibodies. *Open Virol J*. 2011;5:44-51. Prepublished on 2011/06/11 as DOI 10.2174/1874357901105010044 TOVJ-5-44 [pii].

45. Massanella M, Puigdomenech I, Cabrera C, et al. Antigp41 antibodies fail to block early events of virological synapses but inhibit HIV spread between T cells. *AIDS*. 2009;23(2):183-188. Prepublished on 2008/12/23 as DOI 10.1097/QAD.0b013e32831ef1a3 00002030-200901140-00004 [pii].

46. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, et al. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. 1999;189(2):371-380. Prepublished on 1999/01/20 as DOI.

47. Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, et al. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*. 2005;308(5730):1906-1908. Prepublished on 2005/04/30 as DOI 1111781 [pii] 10.1126/science.1111781.

48. Alam SM, McAdams M, Boren D, et al. The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. *J Immunol*. 2007;178(7):4424-4435. Prepublished on 2007/03/21 as DOI 178/7/4424 [pii].

49. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012;13(3):223-228. Prepublished on 2012/02/14 as DOI 10.1038/ni.2236 ni.2236 [pii].

50. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654-657. Prepublished on 2011/05/27 as DOI 10.1038/nature10117 nature10117 [pii].

**Table 1. Inhibitory activity of cell-to-cell transfer by monoclonal antibodies.** Values represent the inhibitory concentration 70 ($IC_{70}$), a concentration of Abs is able to inhibit by 70% the percentage of infected cells in the condition of co-culture. Results are expressed as means ± standard errors of the means (SEM). Statistical analysis of pairwise comparisons were made using Student's unpaired *t* test, $p<0.05$ was considered significant. MoDCs maturation were presented as a Fold Increase (F.I.), calculated as the percentage of CD83-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs in the co-culture conditions in the presence of anti-HIV-1 specific Abs after 48 hours of infection compared to the control without Abs. "+++": > 3 F.I.; "++": between 2 and 3 F.I.; "+": between 1 and 2 F.I.; "-": no F.I.

| Monoclonal IgG | | | HIV-1 BaL | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $IC_{70}$ (µg/mL) | | Statistical analysis | | MoDCs Maturation | |
| | | | T-Cells | MoDCs | | | | |
| Neutralizing antibodies | anti-gp120 | 2G12 | 5 ± 1 | 18 ± 6 | p=0.0205 | n=8 | - | n=2 |
| | | b12 | 11 ± 2 | 48 ± 7 | p<0.0001 | n=13 | ++ | n=6 |
| | | VRC01 | 7 ± 2 | 98 ± 33 | p=0.0159 | n=5 | + | n=4 |
| | | VRC03 | 9 ± 2 | 91 ± 45 | p=0.0286 | n=4 | + | n=3 |
| | anti-gp41 | 2F5 | 27 ± 5 | 13 ± 3 | p=0.0262 | n=12 | ++ | n=6 |
| | | 4 E10 | 47 ± 9 | 19 ± 3 | p=0.0317 | n=13 | +++ | n=7 |
| Non-Neutralizing antibodies | | 4B3 | >100 | >100 | p=0.0159 | n=5 | - | n=3 |
| | | 246-D | >100 | 81 ± 7 | p<0.0001 | n=8 | ++ | n=4 |
| | | b6 | >100 | 88 ± 21 | p=0.1320 | n=6 | +++ | n=4 |
| | | 5F3 | >100 | >100 | p=0.4000 | n=3 | + | n=2 |
| | | 1570-D | >100 | >100 | p=0.8857 | n=4 | - | n=2 |

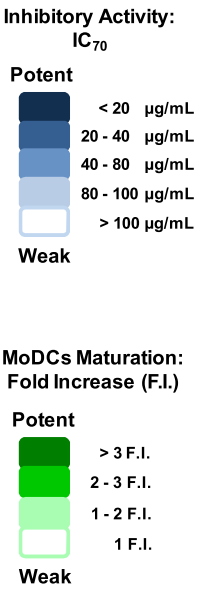


**Figure Legends**

**Figure 1. Schematic representation of the HIV-1 transfer assay.** Immature MoDCs were pulsed with HIV-$1_{BaL}$ for 2 hours. After extensive wash, MoDCs were added to uninfected primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes. The percentage of HIV-1 infected cells in each cellular population was determined by the detection of intracellular viral p24 antigen by flow cytometry.

**Figure 2. Detection of intracellular HIV-1 p24 antigen production in immature MoDCs and primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes.** (A) Dot plot representations of HIV-1 exposed MoDCs (in pink) and CD4 T lymphocytes (in green) in the co-culture. MoDCs and CD4 T lymphocytes were distinguished by flow cytometry by their expression of CD209 and CD3 respectively. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor AZT was added at the same time as CD4 T lymphocytes in the co-culture as negative control of HIV-1 replication. Experiments were performed in duplicate and the mean values of percentage intracellular p24-positive MoDCs or CD4 T lymphocytes are shown in the dot plot. (B) Correlation curve between the mean values of percentage infected MoDCs and infected primary PHA-activated CD4 T lymphocytes in the condition of co-culture. Pearson's correlation coefficient and significance are shown. n=38 experiments performed with different healthy blood donors for (A) and (B).

**Figure 3. Kinetics of HIV-1 fusion and replication in co-cultured MoDCs and primary autologous PHA-activated CD4 T lymphocytes.** HIV-1 fusion inhibitor T20 at 5 µg/mL (A) or reverse transcriptase inhibitor AZT at 5 µM (B) were added at different time on HIV-1-loaded MoDCs/CD4 T lymphocytes co-culture. Infection was determined 48 hours post-infection with HIV-$1_{BaL}$. Data are expressed as means ± standard errors of the means (SEM) of infected cells compared to the control for n=6 (A) or n=4 (B) independent experiments performed with different healthy blood donors. (C) Percentages of infection in each co-cultured cellular population in the presence or absence

of HIV-1 protease inhibitor Indinavir (IDV) at 1 µM. Data are expressed as the means ± SEM for n=14 independent experiments performed with different healthy blood donors.

**Figure 4. Inhibition of HIV-1 *trans*-infection by different HIV-1 specific antibodies.** Anti-HIV-1 specific Abs were added 2 hours after infection of immature MoDCs at the same time as PHA-activated CD4 T lymphocytes. After 48 hours of culture, infection was determined by the detection of HIV-1 intracellular p24 antigen production using flow cytometry or by the detection of viral p24 antigen released into the supernatant by ELISA assay. Percentages of infected MoDCs (black square line) or CD4 T lymphocytes (gray triangle line) when co-cultured in the presence of a panel of different anti-HIV-1 specific Abs: (A) b12, (B) 4E10, (C) b6 and (D) 246-D. Percentage of viral p24 released into the supernatant of the co-culture was shown in black dots, asterisk. Dashed lines correspond to the inhibitory concentration 70 ($IC_{70}$), concentrations of Abs are able to inhibit 70% of infected cells. Curve represented the means of at least 3 independent experiments performed with 3 different healthy blood donors.

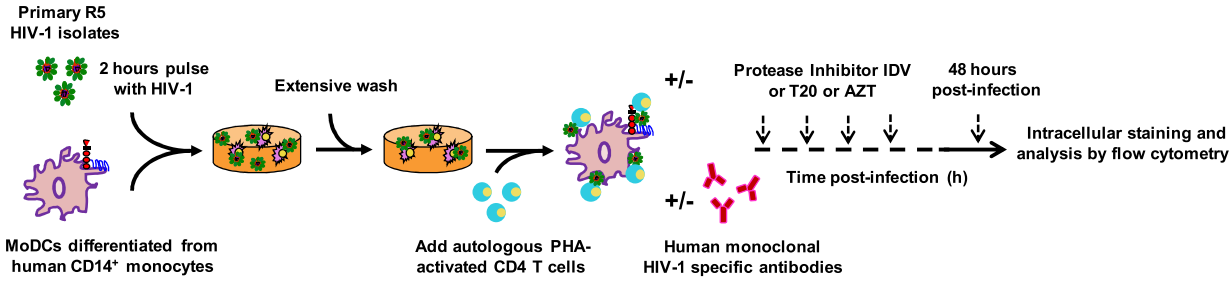
**Figure 5. Correlation between the percentage of infected MoDCs and the percentage of mature MoDCs in the presence of HIV-1 specific antibodies.** Correlation curve between the percentage of infected MoDCs and the percentage of CD83-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs in the presence of serial concentrations of Abs compared to the control without Abs. Data are the means ± SEM of at least 4 experiments performed with different healthy blood donors. Correlations were analyzed using Pearson's correlation coefficient, and significance was set at $p<0.05$.

**Figure 6. MoDCs maturation induced by HIV-1 monoclonal antibody 4E10 in different conditions of culture.** The percentage of CD83-positive DC-SIGN$^+$ MoDCs was determined after 48 hours of culture in the presence or absence of virus, CD4 T lymphocytes or Abs. Data are the means ± SEM of at least 5 experiments performed with different healthy blood donors. Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test), and pairwise comparisons were made using Mann-Whitney *t* test, $p<0.05$ was considered significant.

**Figure 7. Binding capacity of HIV-1 antibodies to MoDCs.** The binding capacity of different anti-HIV-1 specific Abs to MoDCs was measured (red curve). FcγRs were blocked by the addition of 10 µg/mL of anti-FcγRI (CD64), anti-FcγRII (CD32) and anti-FcγRIII (CD16) to MoDCs for 30 min before addition of the different anti-HIV-1 specific Abs 4E10, 2F5, 246-D and 4B3 with 100 µg/mL (blue curve). Data are representative of at least 3 independent experiments performed with cells from different healthy blood donors.

## Figures

### Figure 1.




### Figure 2.

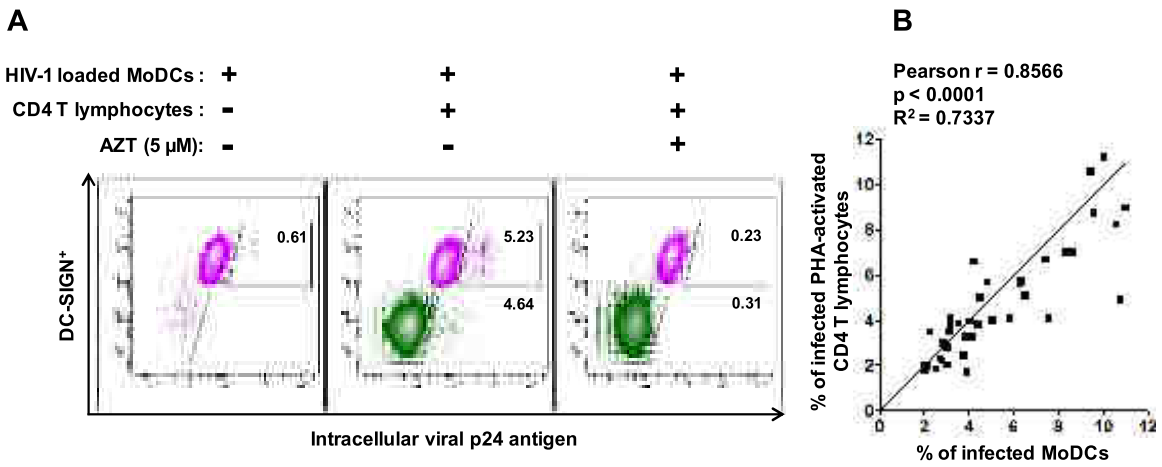


**Figure 3.**

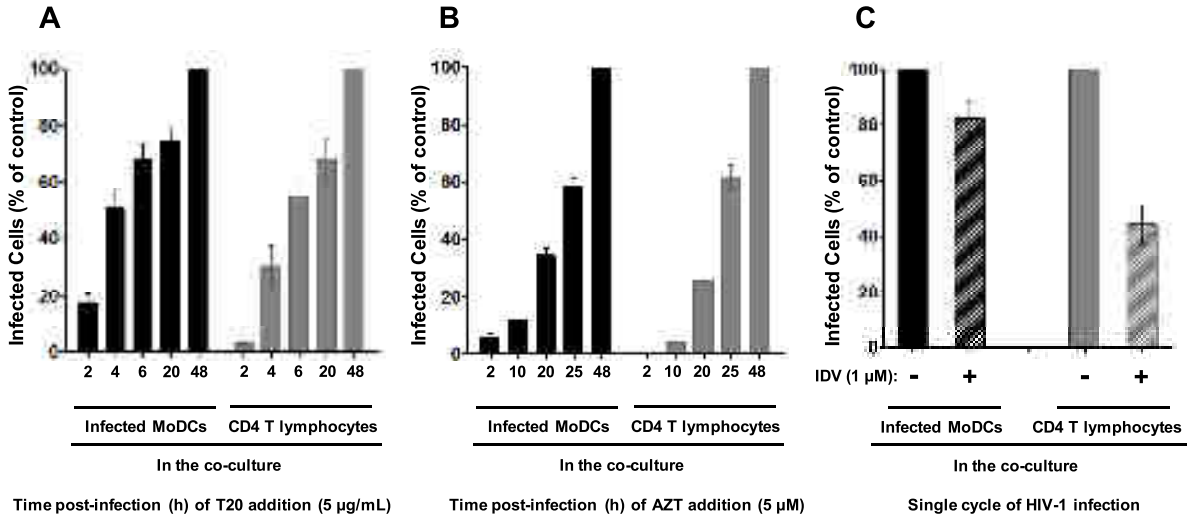



**Figure 4.**

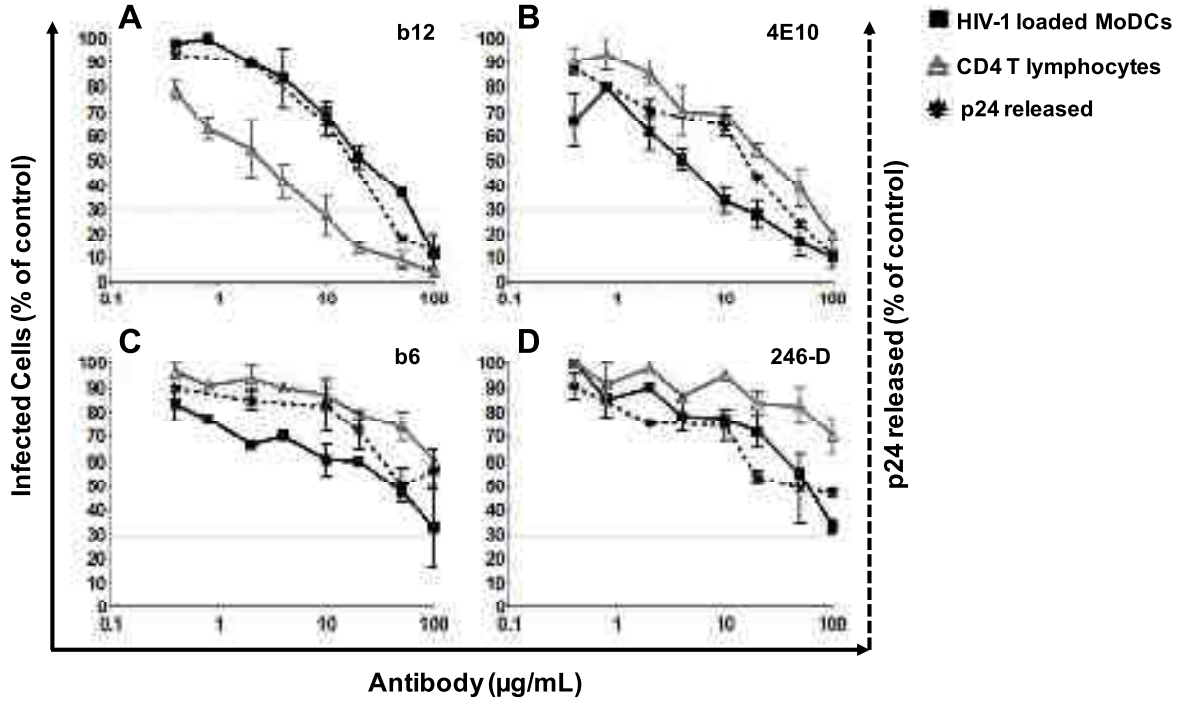


**Figure 5.**

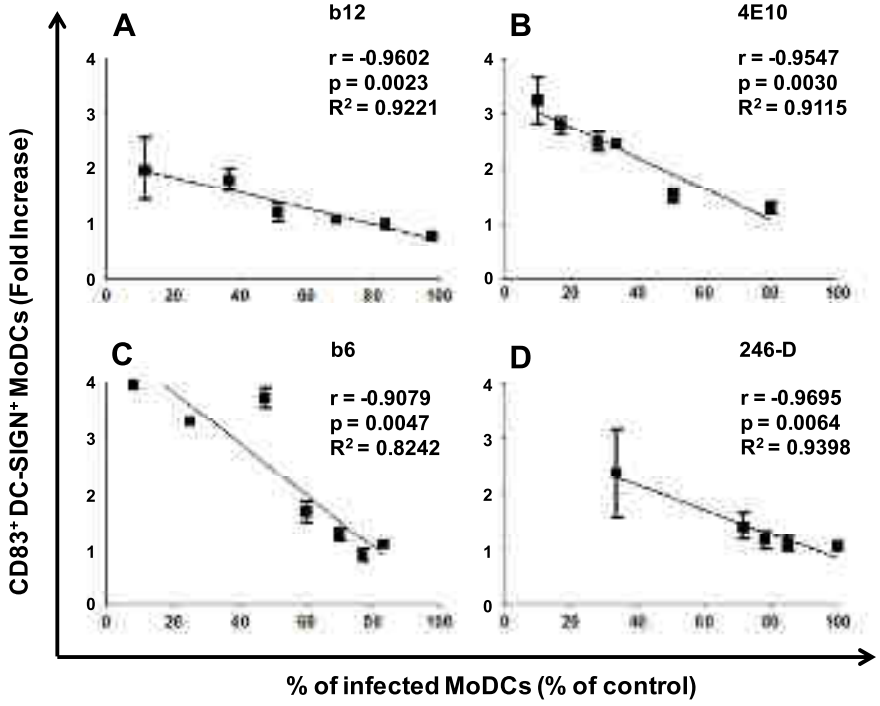



**Figure 6.**

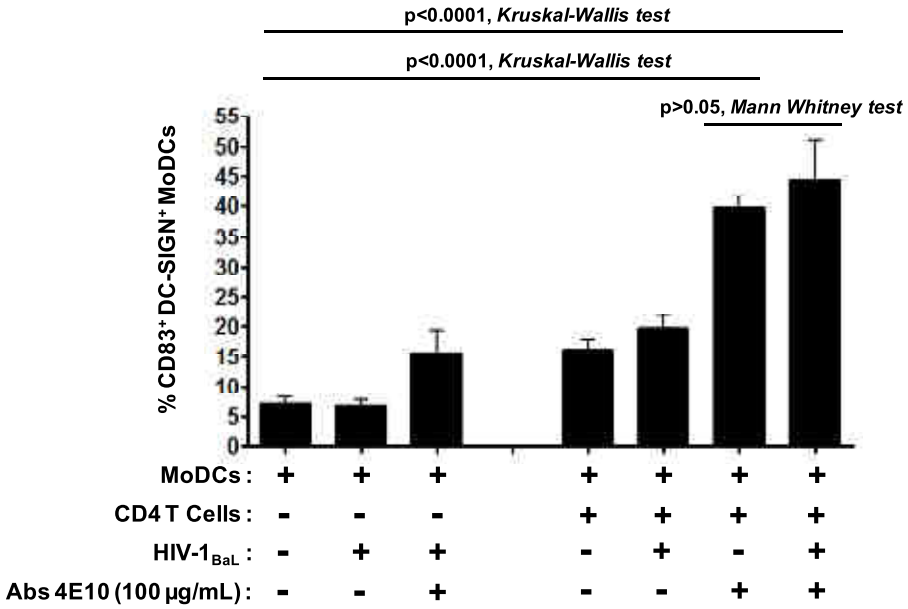
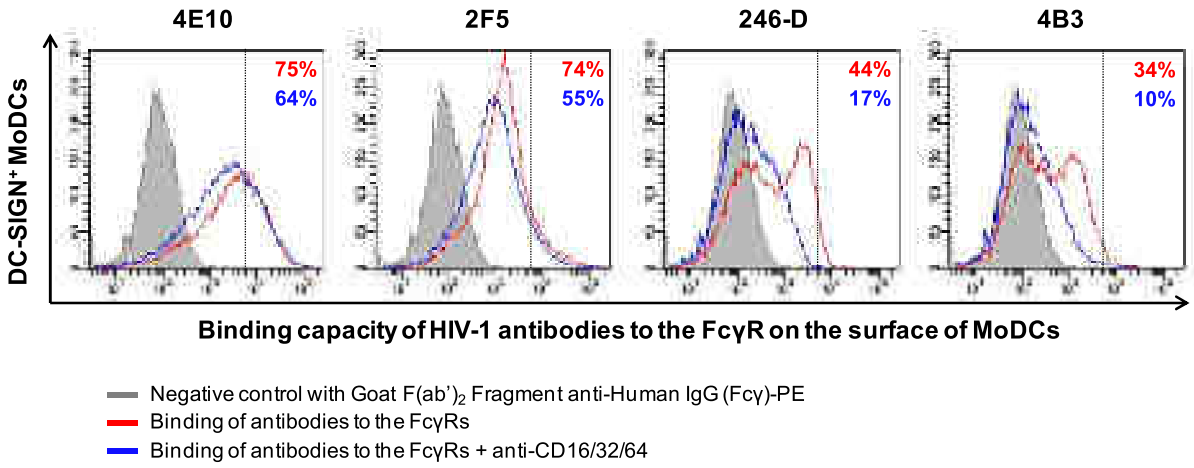


**Figure 7.**




Negative control with Goat F(ab')$_2$ Fragment anti-Human IgG (Fcγ)-PE
Binding of antibodies to the FcγRs
Binding of antibodies to the FcγRs + anti-CD16/32/64

**Supplemental Figures**

**Figure S1. Inhibition of HIV-1 *trans*-infection by HIV-1 specific antibodies in the presence or absence of protease inhibitor.** The protease inhibitor Indinavir IDV (1 µM) was added at the same time as HIV-1 monoclonal Abs b12 (A, C) and 4E10 (B, D). After 48 hours co-culture, the percentage of infected CD4 T lymphocytes (C, D) or infected MoDCs (A, B) was determined by the detection of HIV-1 intracellular p24 antigen production using flow cytometry. Data are means of at least two representative experiments.

**Figure S2. MoDCs maturation induced by HIV-1 specific antibodies.** The percentage of CD83-positive DC-SIGN$^{+}$ MoDCs in the co-culture was determined in the presence or absence of anti-HIV-1 specific Abs after 48 hours of infection. All experiments were performed at least 3 times with different healthy blood donors. Representative data are shown.

**Figure S3. Comparison of HIV-1 antibodies inhibition between cell-to-cell transfer and conventional neutralizing assays using free viral particles.** The inhibition capacity of NAbs in cell-to-cell transfer (transfer protocol) and cell-free HIV-1 particles (conventional neutralization protocol) was analyzed. Data, expressed as means ± SEM, represent the inhibitory concentration 70 ($IC_{70}$) of Abs for n=3 experiments performed with different healthy blood donors. Pairwise comparisons were made using Mann Whitney *t* test, $p<0.05$ was considered significant.

**Figure S1.**

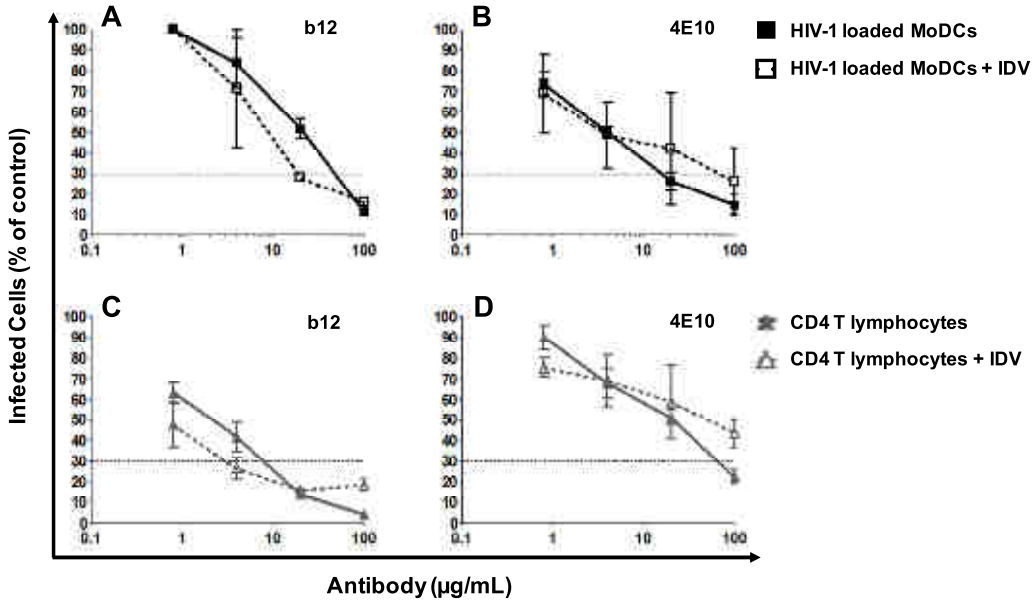



**Figure S2.**

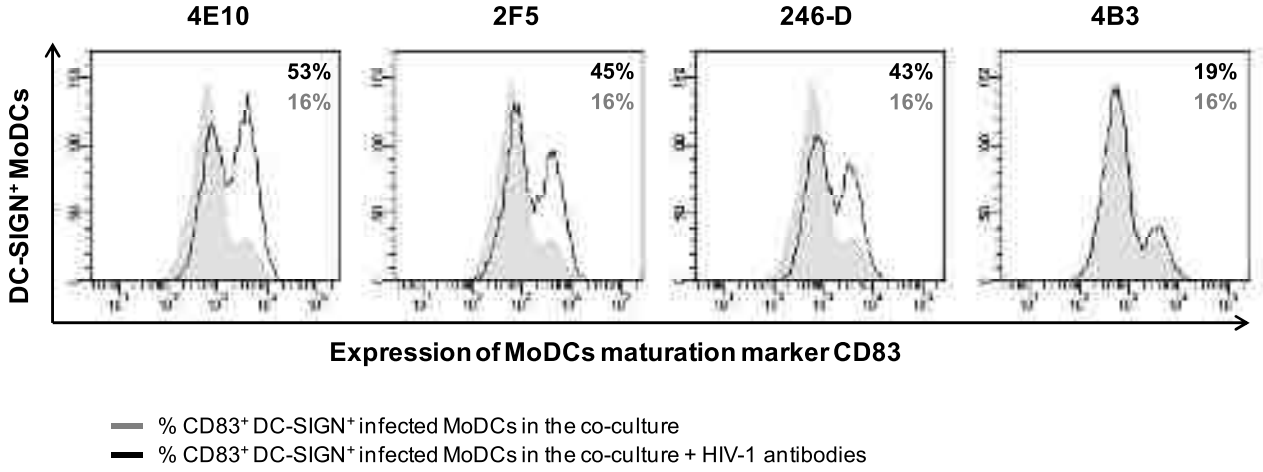
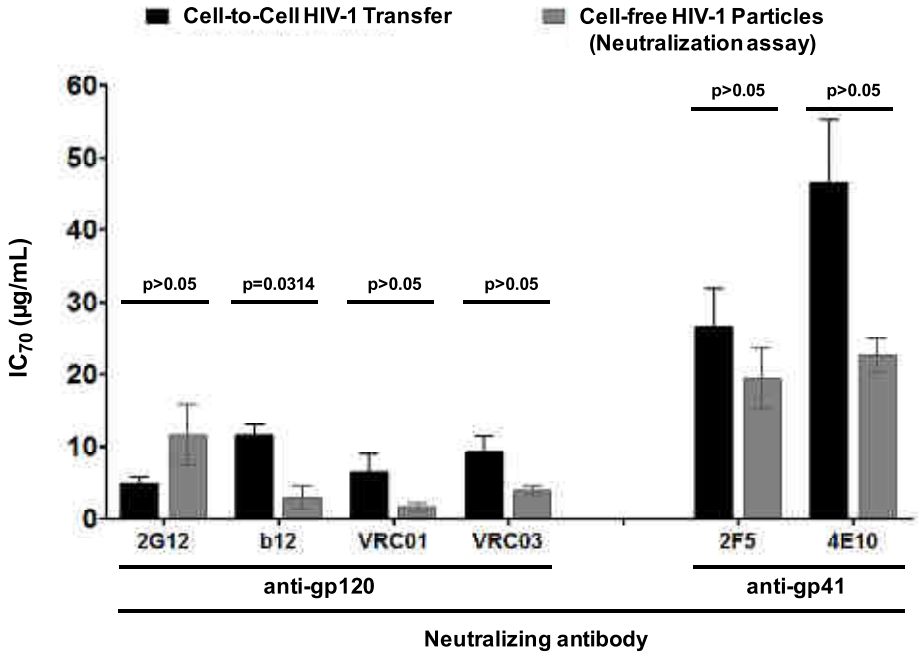


**Figure S3.**


Cell-to-Cell HIV-1 Transfer
Cell-free HIV-1 Particles (Neutralization assay)
IC70 (µg/mL)
60
50
40
30
20
10
0
p>0.05
p=0.0314
p>0.05
p>0.05
p>0.05
p>0.05
2G12
b12
VRC01
VRC03
2F5
4E10
anti-gp120
anti-gp41
Neutralizing antibody

# Conclusion

**Discussion et poursuite des travaux**

Depuis la découverte du VIH-1 en 1983, les connaissances sur la physiopathologie de ce virus ont considérablement progressée, cependant aucun traitement curatif ou aucun vaccin n'a pu être mis au point. Les traitements disponibles sont de plus en plus efficaces en améliorant l'espérance de vie et la qualité de vie des individus infectés sans permettre leur guérison. Dans ces conditions, le développement d'un vaccin semble la seule solution pour stopper la pandémie.

L'idée qu'un vaccin efficace contre le VIH-1 nécessitera l'induction d'une réponse immunitaire adaptative humorale et cellulaire semble désormais faire consensus au sein de la communauté scientifique. Certains individus infectés par le VIH-1 développent des anticorps capables de neutraliser un large spectre d'isolats primaires de VIH-1 (Sather et al., 2008; Simek et al., 2009; Stamatatos et al., 2009). Le transfert passif de ces anticorps neutralisants dans le modèle pathogène de singe a permis de protéger ces animaux contre l'infection (Hessell et al., 2009a; Mascola et al., 2000). Néanmoins, les protocoles de vaccination n'ont pas été en mesure d'induire de tels anticorps chez l'être humain.

Par ailleurs, la principale voie de contamination par le VIH-1 est la voie sexuelle (plus de 80 % des infections) où résident de nombreux types cellulaires ciblés par le virus dont les cellules dendritiques (DC). Dans ces conditions, nous nous sommes intéressés à l'activité inhibitrice des anticorps spécifiques du VIH-1 sur l'infection des DC primaires, ainsi que sur l'inhibition du transfert du VIH-1 des DC aux lymphocytes T CD4.

Le laboratoire étudie différent modèles de DC primaires susceptible de répliquer le VIH-1 : les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC), les cellules dendritiques interstitielles (intDC) et les cellules de Langerhans (LC) ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Les pDC constituent le sujet principal de ces travaux de thèse.

***Inhibition de l'infection des pDC par les anticorps neutralisant le VIH-1***

Nous avons analysé l'activité inhibitrice des anticorps neutralisants (AcN) spécifiques du VIH-1 sur l'infection des pDC, à la fois sur les pDC primaires et la lignée cellulaire de pDC GEN2.2 (Manuscrit 1). Parmi les six AcN de large spectre, tous ont été capables d'inhiber l'infection des pDC par le VIH-1. L'infection des pDC par le VIH-1 n'a pas induit de mortalité cellulaire. De plus, nous n'avons pas observé de différence de maturation des pDC lorsqu'elles étaient incubées avec ou sans le VIH-1 en présence ou en absence d'Ac. Ces résultats indiquent que la viabilité et la maturation cellulaire n'ont pas joués de rôles dans l'inhibition de l'infection des pDC par les AcN. La concentration nécessaire pour inhiber le pourcentage d'infection des cellules de 90 % (IC90) de ces AcN s'est révélée être plus importante que celle nécessaire pour inhiber l'infection des MoDC (Holl et al., 2006a) ou des LC et intDC (Publication 2). Dans ces populations de DC

myéloïdes, l'activité inhibitrice plus élevée des AcN reposait sur l'interaction entre le fragment Fc des AcN et les RFcγ présent à la surface de ces cellules. Le RFcγIIa étant exprimé à la surface de 30 à 50 % des pDC du sang (Bave et al., 2003), nous avons comparé l'activité inhibitrice d'un AcN, b12, et de sa version mutée incapable de se fixer aux RFcγ, LALA, sur l'infection des pDC (primaires et GEN2.2) par le VIH-1. Ces deux anticorps ont inhibé l'infection des pDC par le VIH-1 de façon similaire. De plus, le blocage par un anticorps du RFcγII à la surface des pDC n'a pas permis de diminuer l'activité inhibitrice de l'AcN VRC01. En outre, nous avons analysé l'activité sur les pDC d'anticorps non neutralisant inhibiteurs (AcNNI) incapables d'inhiber l'infection des lymphocytes T CD4 par le VIH-1 (« non-neutralisant ») mais pourtant capables d'inhiber l'infection de cellules via les RFcγ (« inhibiteurs ») comme les macrophages, les MoDC (Holl et al., 2006a) ou les LC et intDC (Publication 2). Les AcNNI n'ont pas été en mesure de protéger les pDC primaires ou les cellules GEN2.2 de l'infection par le VIH-1 (Manuscrit 1). L'ensemble de ces résultats indiquent que le RFcγIIa présent à la surface des pDC ne participe pas à l'inhibition de l'infection par le VIH-1. Des résultats similaires avaient été observés avec une lignée très largement utilisée dans les tests de neutralisation, la lignée TZM-bl, surexprimant chacun des RFcγ (Perez et al., 2009). Seule une inhibition dépendante des RFcγI et RFcγIIb avait été observé, alors que les RFcγIIa et RFcγIIIa ne participaient peu ou pas à l'inhibition de l'infection des TZM-bl par les anticorps. De même, une inhibition dépendante des RFcγII a été détectée dans les mDC exprimant de manière concomitante les RFcγIIa et RFcγIIb. Ces résultats suggèrent un rôle prépondérant du RFcγIIb dans l'inhibition de l'infection des mDC par les anticorps. Récemment, une étude a analysé *in vitro* la participation des RFcγII en modifiant le fragment Fc de l'AcN b12 pour augmenter ou diminuer sa fixation au RFcγIIa ou RFcγIIIa (Moldt et al., 2011). Des expériences similaires devraient être entreprises afin de préciser le rôle du RFcγIIb dans le mécanisme d'inhibition du VIH-1 par les anticorps.

Les pDC sont capables de sécréter de forte quantité de cytokines et de chimiokines, et en particulier des interférons (IFN) de type I. Nous avons analysé la production cytokinique dans le surnageant des pDC au cours des tests de neutralisation. Nous avons montré que les pDC produisent de l'IFN-α en présence de VIH-1. Cette production de cytokine n'est pas supprimée en présence d'AcN inhibant l'infection des pDC. En effet, elle est maintenue à un niveau similaire en présence et en absence des AcN, à l'exception pour l'anticorps b12 et sa version mutée dans la partie Fc LALA. Ces résultats similaires observé pour l'AcN b12 et LALA démontre que la fixation de l'anticorps aux RFcγ n'est pas responsable de la diminution de la production d'IFN-α induite par ces anticorps. La diminution de la production d'IFN-α induite par l'AcN b12 a également été observée dans une autre étude qui proposait que le blocage de l'interaction entre la gp120 et le CD4 permettait d'inhiber la production d'IFN-α par les pDC en réponse au VIH-1 (Beignon et al., 2005). Bien que les protocoles expérimentaux soient différents (concentrations cellulaires,

concentrations en virus, sous-type viral), nous n'observons pas d'inhibition complète de la production d'IFN-α en présence de forte concentration de l'AcN b12. De plus, nous n'observons aucune diminution de cette production en présence de l'AcN VRC01, alors que VRC01 bloque également la fixation du CD4 sur la gp120. Ces résultats suggèrent que la diminution de la production d'IFN-α par l'AcN b12 est indépendante de l'inhibition de la fixation du VIH-1 au CD4. L'épitope précis reconnu par l'AcN b12 pourrait être à l'origine de cette diminution de la production d'IFN-α, et un panel d'anticorps (neutralisant ou non) dirigés contre des sites voisins du site de fixation au CD4 de la gp120 devraient être criblé. Aussi, les complexes immuns formés en présence de l'AcN b12 pourraient être difficiles à endocyter par les pDC et donc stimuleraient peu ces cellules. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin de comprendre le mécanisme d'inhibition de la production d'IFN-α lié à cet anticorps.

Par ailleurs, nous avons analysé la production des cytokines et chimiokines MIP-1α, MIP-1β, IL-6 et TNF-α par les pDC lors des tests de neutralisations. La production de ces molécules par les pDC n'a pas été diminuée lorsque les AcN ont inhibé l'infection des cellules. Dans le cas de l'AcN anti-gp41 4E10, la production de MIP-1α et MIP-1β a même été augmentée. L'AcN 4E10 est un anticorps polyréactif qui reconnait la gp41 mais est également capable de se fixer aux phospholipides comme les cardiolipines. Une étude a démontré que l'incubation d'anticorps dirigés contre les cardiolipines avec des monocytes entrainaient la production de MIP-1α et MIP-1β (Moody et al., 2010). Bien que nous n'ayons pas mesuré de production de MIP-1α et MIP-1β par les pDC en présence de l'AcN 4E10 seul, cet anticorps pourrait avoir un effet potentialisateur sur la production de ces chimiokines par les pDC incubées avec le VIH-1. Des expériences utilisant des anticorps anti-cardiolipines mais incapables de se fixer au VIH-1 pourraient permettre de démontrer si la production de MIP-1α et MIP-1β par les pDC incubées avec le VIH-1 peut être augmentée.

Ces résultats montrent que l'infection des pDC par le VIH-1 est inhibée par les AcN par un mécanisme indépendant du RFcγIIa. La protection conférée par ces AcN ne supprime pas la sécrétion cytokinique des pDC induite par le VIH-1. Ainsi les pDC pourraient induire un environnement antiviral et recruter des cellules de l'immunité très tôt au cours de la transmission, pendant que les AcN protègent l'ensemble de l'organisme de l'infection.

***Inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4***

Dans la seconde partie de ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'inhibition du transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 (Manuscrit 2). En effet, plusieurs études ont montré que les DC sont capables de transférer le VIH-1 aux lymphocytes T CD4, et que ce transfert constitue une voie de dissémination du virus lors de l'infection (voir Introduction).

Nous avons montré que le transfert du VIH-1 se produit en *cis* et en *trans* démontrant que la réplication du VIH-1 dans les pDC n'est pas nécessaire pour transmettre le virus aux lymphocytes T CD4. De plus nous avons observé une augmentation du pourcentage d'infection des pDC en coculture suite à un second cycle de réplication du VIH-1. Dans nos travaux sur le transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4, nous avons également observé une augmentation du pourcentage d'infection des MoDC dans la co-culture dépendante du contact direct entre ces cellules et les lymphocytes T CD4 (Publication 1). Toutefois, l'infection des MoDC dans la coculture est issue principalement d'un unique cycle de réplication viral (Manuscrit 3). Le rôle des lymphocytes T CD4 dans l'augmentation du pourcentage d'infection des pDC dans la coculture pourrait être approfondi en étudiant le rôle du contact entre ces cellules (expériences en trans-well) et le rôle du virus produit par ces lymphocytes T CD4 dans laugmentation de l'infection des pDC en coculture.

Nous avons montré que l'AcN VRC01 inhibe le transfert en *trans* et en *cis* du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4. Cette inhibition est dépendante de la concentration en AcN et indépendante de la viabilité des cellules, de leur état d'activation ou de maturation ainsi que de la production d'IFN-α dans le surnageant. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour analyser la capacité d'autres AcN à inhiber ce transfert. De plus, nos travaux, ainsi que ceux d'autres laboratoires, ont permis de montrer l'inhibition du transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4 par les AcN (Publication 1, Manuscrit 3). Ces résultats sont cohérent avec l'idée que le transfert du VIH-1 au niveau des synapses virologiques reste sensible à l'activité des AcN (Yu et al., 2008; Cavrois et al., 2007; Frankel et al., 1998), à l'inverse d'autres études suggérant que ces sites sont imperméables aux anticorps (Chen et al., 2007; Ganesh et al., 2004). Les AcNNI n'ont pas permis d'inhiber le transfert du VIH-1 des MoDC aux lymphocytes T CD4, indiquant que seule l'activité neutralisante des anticorps permet de protéger les lymphocytes T CD4 du transfert du VIH-1. Ces AcNNI ne devraient donc pas inhiber le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.

De manière intéressante, une diminution de la réplication du VIH-1 dans les MoD a été observée dans les conditions de transfert et cette inhibition a été corrélée avec la maturation (expression du CD83) des MoDC (Manuscrit 3). Bien que nous n'observions pas d'augmentation de l'expression du CD83 à la surface des pDC, l'AcN VRC01 a inhibé en partie l'infection des pDC par le VIH-1 dans nos conditions de transfert. Les résultats suggérent qu'une partie du virus restant à la surface des cellules au moment de la co-culture est sensible à la neutralisation. Cependant, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si cette inhibition est dépendante de la fixation de l'anticorps au VIH-1.

Enfin nous avons mesuré une augmentation de la production d'IFN-α dans le surnageant de la coculture. Le mécanisme de cette augmentation ainsi que l'effet de la cytokine antivirale sur la réplication du VIH-1 devra être analysé. De plus, les pDC secrètent les chimiokines MIP-1α et MIP-1β capables à la fois de recruter les lymphocytes T CD4 par chimiotactisme et d'inhiber l'infection des cellules via le blocage du corécepteur CCR5. L'analyse de la production de ces chimiokines dans le surnageant de la coculture pourrait également être analysé. L'effet de ces chimiokines sur le transfert du VIH-1 ne peut être étudié en bloquant leur récepteur puisqu'il s'agit du corécepteur du VIH-1. Toutefois, des anticorps bloquant ces chimiokines elles-mêmes ou l'utilisation d'un virus de tropisme X4 pourraient permettre de s'affranchir de cette contrainte.

Le mécanisme de transfert du VIH-1 est complexe puisqu'il implique un transfert en *cis*, un transfert en *trans*, les synapses virologiques, les lectines jouant le rôle de récepteurs alternatifs du VIH-1 et les cytokines produites par les cellules de l'immunité. Dans la partie Publication 2, nous n'avons pas discuté du rôle d'éventuels récepteurs alternatifs du VIH-1 présent à la surface des pDC sur le transfert. En effet, certaines protéines présentes à la surface des DC sont capables de fixer le VIH-1 ou la gp120 du virus, et participent au transfert du VIH-1 de cellules à cellules, telles que le DC-SIGN (Wu and KewalRamani, 2006). Une étude a montré que DCIR, à la surface des MoDC, pouvait jouer le rôle de récepteur alternatif du VIH-1 (Lambert et al., 2008). Cette lectine est également présente à la surface des pDC. De plus, la gp120 du VIH-1 est capable de se fixer sur BDCA-2, exprimé par les pDC (Martinelli et al., 2007). La participation de ces lectines ainsi que d'autres protéines comme BDCA-4 et ILT-7 dans le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 devrait être évaluée. Les expériences visant à déterminer si une protéine est un récepteur alternatif du VIH-1 et si elle participe dans le transfert reposent en général sur un protocole où des anticorps dirigés contre cette protéine sont incubés avec les cellules avant d'ajouter le VIH-1 puis de mesurer le pourcentage d'infection des cellules cibles. Néanmoins, cette procédure pourrait s'avérer inadaptée aux pDC, puisque la fixation d'un anticorps sur les protéines BDCA-2, BDCA-4, DCIR ou ILT-7 entraîne une diminution de la production d'IFN-α par les pDC (Dzionek et al., 2001; Gilliet et al., 2008; Meyer-Wentrup et al., 2008). Nous formulons l'hypothèse suivante : si les Ac dirigés contre les protéines de surface permettent de réduire la quantité de virus fixé à la surface des pDC et donc de réduire le transfert, l'inhibition de la production d'IFN-α déclenchée par ces anticorps pourrait au contraire être favorable à la réplication du virus dans les pDC et les lymphocytes T CD4 puisque la mise en place du microenvironnement antiviral est entravée. Dans ces conditions, il est absolument nécessaire d'examiner la capacité des IFN de type I à inhiber l'infection des lymphocytes T CD4 par le VIH-1 dans les expériences de transfert. Afin de palier au problème de la double action des anticorps dirigés contre les protéines de surface, la solution du knock-down de l'expression de ces

protéines par siRNA pourrait être envisagée. Toutefois le nombre de pDC purifié par poche de sang (entre 1 et $2.10^6$ cellules) pourrait être trop faible pour de telles expériences. Récemment, un modèle de pDC primaires différenciées à partir de cellules $CD34^+$ de sang de cordon a été mis au point permettant d'obtenir un nombre plus important de cellules (Demoulin et al., 2012). Ce protocole pourrait être utilisé au laboratoire puisque nous différencions les LC et intDC à partir de cellules $CD34^+$ de sang de cordon. Ce modèle permettrait d'étudier le rôle de lectines dans le transfert du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4.

**Perspectives**

Nous avons montré que les pDC sont protégées de l'infection par le VIH-1 par les AcN et qu'elles conservent leur capacité à produire des cytokines et chimiokines dans ces conditions. Cette étude pourrait être poursuivie dans un modèle *in vivo* d'infection. Lors d'expériences de transfert passif d'AcN dans le modèle d'infection pathogène du macaque, la réponse cytokiniques et notamment la production d'IFN-α pourrait être mesurée chez ces animaux. Plus particulièrement, la diminution de la production d'IFN-α spécifiquement observée pour l'AcN b12 *in vitro* pourrait être recherchée dans ce modèle *in vivo.* Cet AcN est fréquemment utilisé dans les expériences de transfert passif d'Ac chez le macaque, et a permis de protéger les animaux contre l'infection expérimentale (Hessell et al., 2007; Hessell et al., 2009a). De manière plus générale, l'état d'activation du système immunitaire de ces animaux lors d'expériences de transfert passif d'AcN pourrait être analysé.

Par ailleurs, la production d'IFN-α dans les modèles pathogène et non pathogène de l'infection par le SIV est similaire lors de la phase aigüe de l'infection (Bosinger et al., 2009; Diop et al., 2008; Harris et al., 2010; Jacquelin et al., 2009). Une étude menée sur les modèles d'infection pathogène du SIV ont permis de montrer que les pDC s'activent et migrent vers les GALT chez le macaque (Kwa et al., 2011). De plus, la comparaison des modèles pathogène et non-pathogène a montré que la migration pDC chez le macaque (modèle pathogène) était plus forte que pour les pDC de singe vert (modèle non-pathogène) (Campillo-Gimenez et al., 2009). Nous n'avons pas observé de maturation des pDC lors de l'infection par le VIH-1 en absence ou en présence d'AcN capable d'inhiber l'infection de ces cellules. Des études supplémentaires pourraient être envisagée afin d'analyser l'expression de marqueurs d'activation comme le CD80 ou le CD86 ainsi que l'expression de récepteurs impliqués dans la migration des pDC (CCR7 ou intégrine α4β7) lors des tests de neutralisations. Aussi, l'état d'activation et la maturation des pDC pourraient être étudiés dans le modèle d'infection pathogène du SIV lors de transfert passif d'AcN, afin d'évaluer le rôle de ces phénomènes dans la progression vers l'infection.

L'infection de nombreuses populations cellulaires par le VIH-1 peut être inhibée par les AcN, en plus des lymphocytes T CD4. De plus, les DC myéloïdes, populations cellulaires considérées comme les premières cibles du virus lors de la transmission au niveau des muqueuses, sont protégées par les AcN mais également par les AcNNI via un mécanisme dépendant de la fixation de ces Ac aux RFcγ. La participation des RFcγ à la protection contre l'infection est également détectée dans les études *in vivo* dans le modèle animal d'infection pathogène. En effet, le transfert passif de l'AcN b12 et de sa version mutée LALA (incapable de se fixer au RFcγ) a été comparé dans ce modèle d'infection (Hessell et al., 2007). Suite au challenge vaginal, l'administration intraveineuse de l'AcN b12 a permis de protéger presque tous les macaques (8/9), alors que l'Ac LALA, à la même concentration, n'a protégé que 5 des 9 macaques, démontrant la participation de la fixation de l'AcN b12 aux RFcγ dans la protection contre l'infection. Une autre étude utilisant une version de l'AcN b12 capable de se fixer plus fortement au RFcγIIIa n'a pas permis d'augmenter le pouvoir protecteur de l'Ac dans le modèle pathogène du singe, suggérant que l'activité inhibitrice des Ac dans la protection implique des activités Fc-dépendante différente de l'activité d'ADCC (Moldt et al., 2012). Nos résultats indiquent en plus que le RFcγIIa, exprimé par les pDC, ne participe pas à l'inhibition Fc-dépendante de l'infection, soulignant que la participation du RFcγIIb ou l'équilibre dans l'expression des RFcγIIa/RFcγIIb devrait être étudiée plus en détail.

La protection conférée par les anticorps contre l'infection par le VIH-1 repose sur une activité neutralisante mais implique également des mécanismes dépendant des RFcγ. Cependant aucun protocole, à ce jour, n'a permis d'induire des AcN un large spectre d'isolats primaires par vaccination (Mascola and Montefiori, 2010). Dans ces conditions, l'induction d'Ac non-neutralisants capables d'inhiber l'infection par le VIH-1 via des mécanismes dépendants des RFc pourrait être une alternative. En effet, certains Ac non-neutralisants ont été capable d'inhiber l'infection de cellules cibles en présence de cellules effectrices comme les cellules NK ou des cellules exprimant les RFcγ, alors qu'aucune inhibition n'a pu être mesurée avec les fragments F(ab)'$_2$ de ces Ac (Forthal et al., 2001). De même, nos résultats montrent que des AcNNI protègent les DC myéloïdes de l'infection par le VIH-1 (Publication 2). Une étude menée sur le modèle animal pathogène a montré qu'un AcNNI, le F240, bien que n'ayant pas protégé tous les animaux de l'infection, a permis de diminuer le pic de virémie chez les animaux infectés (Burton et al., 2011). Au cours de l'infection par le VIH-1, des Ac non-neutralisants apparaissent quelques jours après le début de la phase aigüe et sont capables de former des complexes immuns avec le virus fondateur (Tomaras et al., 2008), suggérant que ces Ac puissent être plus faciles à induire.

De tels Ac, s'ils étaient déjà présents au moment de la transmission, pourraient permettre une protection au moins partielle contre l'infection.

Toutefois, si cette activité antivirale dépendante du fragment Fc n'était pas suffisante, l'induction d'AcN resterait une nécessité dans le développement d'une stratégie vaccinale. Etant donné la forte variabilité du virus, les recherches se sont orientées vers les anticorps neutralisant un large spectre d'isolats primaires de VIH-1. Néanmoins, les études portant sur la transmission du VIH-1 montrent que la majorité des infections par voies muqueuses résultent d'une infection par un unique virus fondateur (Keele et al., 2008), et que les individus infectés sont capables de développer une réponse humorale neutralisante contre ce virus fondateur via des AcN dits autologues. Au cours de l'infection, le virus fondateur sensible à ces anticorps est remplacé par des virus mutés et résistants à ces anticorps (Wei et al., 2003; Richman et al., 2003), démontrant que ces AcN autologues ne sont pas de large spectre. Mais si ces AcN autologues étaient déjà présent au moment de la transmission, ils pourraient participer à la protection contre l'infection par le VIH-1 en bloquant le virus fondateur. Des études devraient être menées pour déterminer plus précisément les caractéristiques de ces virus fondateurs, et des tests de neutralisations utilisant spécifiquement ces virus fondateurs pourraient permettre de mieux définir les caractéristiques des AcN à induire par vaccination. Aussi, des expériences de transferts passifs d'Ac dans les modèles pathogènes du SIV devraient être menées avec des virus possédant les caractéristiques des virus fondateurs. Ces études permettraient d'analyser le rôle des AcNNI et des AcN autologues, seuls ou en combinaisons, dans la protection contre l'infection.

L'étude des AcNNI et des AcN autologues devrait constituer un axe de recherche supplémentaire. Ces AcN autologues et les AcNNI pourraient être suffisamment efficace pour inhiber l'infection par le VIH-1 dans certaines conditions comme la transmission par voie sexuelle. Pour autant, il ne faudrait pas perdre de vue l'étude des AcN de large spectre qui restent une solution idéal pour le développement d'un vaccin. Plusieurs AcN de large spectre ont été mis en évidence ces dernières années : l'AcN VRC01 qui reconnait le site de fixation au CD4 de la gp120 (Wu et al., 2010), les AcN PG9 et PG16 (ainsi que certains PGT) capables de se fixer à un épitope quaternaire de l'enveloppe virale (Walker et al., 2011; Walker et al., 2009). Les AcN de large spectre possèdent généralement des caractéristiques particulières : un domaine CDR3 $V_H$ allongé, une polyréactivité, et/ou un nombre de mutation somatique élevé (McElrath and Haynes, 2010), et sont retrouvés chez 10 à 25 % des individus infectés (Sather et al., 2009; Simek et al., 2009; Stamatatos et al., 2009). Des techniques plus performantes de criblage des AcN pourraient permettre de mettre en évidence d'autres épitopes neutralisants constituant de nouvelles cibles pour le développement d'immunogènes. Cependant, l'induction de tels AcN

nécessite une meilleure compréhension des mécanismes permettant l'émergence d'une réponse humorale ayant toutes les caractéristiques de ces AcN.

En conclusion, les anticorps permettant une protection efficace contre l'infection par le VIH-1 devraient posséder une activité neutralisante capable de protéger toute les cellules cibles du virus et un fragment Fc capable d'induire une activité antivirale dépendante des RFcγ. Un vaccin capable d'induire de tels anticorps associés à une activité cytotoxique forte pourraient permettre d'établir une protection stérilisante lors de la transmission par voie sexuelle du VIH-1.

# Bibliographie

Agace, W.W., Amara, A., Roberts, A.I., Pablos, J.L., Thelen, S., Uguccioni, M., Li, X.Y., Marsal, J., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T.*, et al.* (2000). Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. Curr Biol *10*, 325-328.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology *4*, 499-511.

Amanna, I.J., Messaoudi, I., and Slifka, M.K. (2008). Protective immunity following vaccination: how is it defined? Hum Vaccin *4*, 316-319.

Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. Retrovirology *7*, 96.

Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T.D., Conrad, T.P., Lempicki, R.A.*, et al.* (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin α4β7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. Nature Immunology *9*, 301-309.

Asmuth, D.M., Abel, K., George, M.D., Dandekar, S., Pollard, R.B., and Miller, C.J. (2007). Pegylated interferon-?2a treatment of chronic SIV-infected macaques. Journal of Medical Primatology *0*, 070405111913001-???

Audige, A., Urosevic, M., Schlaepfer, E., Walker, R., Powell, D., Hallenberger, S., Joller, H., Simon, H.U., Dummer, R., and Speck, R.F. (2006). Anti-HIV state but not apoptosis depends on IFN signature in CD4+ T cells. J Immunol *177*, 6227-6237.

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

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245-252.

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

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

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

Bave, U., Magnusson, M., Eloranta, M.L., Perers, A., Alm, G.V., and Ronnblom, L. (2003). Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. J Immunol *171*, 3296-3302.

Beignon, A.S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. J Clin Invest *115*, 3265-3275.

Benitez-Ribas, D. (2006). Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc RII-mediated uptake. Journal of Experimental Medicine *203*, 1629-1635.

Biancotto, A., Grivel, J.C., Iglehart, S.J., Vanpouille, C., Lisco, A., Sieg, S.F., Debernardo, R., Garate, K., Rodriguez, B., Margolis, L.B.*, et al.* (2007). Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. Blood *109*, 4272-4279.

Binley, J.M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M.B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H.*, et al.* (2004). Comprehensive Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. Journal of Virology *78*, 13232-13252.

Blue, C. (2004). The relevance of complement to virus biology. Virology *319*, 176-184.

Blum, A., Chaperot, L., Molens, J., Foissaud, V., Plantaz, D., and Plumas, J. (2006). Mechanisms of TRAIL-induced apoptosis in leukemic plasmacytoid dendritic cells. Experimental Hematology *34*, 1655-1662.

Boasso, A., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., and Shearer, G.M. (2008). HIV-induced type I interferon and tryptophan catabolism drive T cell dysfunction despite phenotypic activation. PLoS ONE *3*, e2961.

Boasso, A., Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Fuchs, D., and Shearer, G.M. (2007). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. Blood *109*, 3351-3359.

Boasso, A., and Shearer, G.M. (2008). Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. Clinical Immunology *126*, 235-242.

Bosinger, S.E., Li, Q., Gordon, S.N., Klatt, N.R., Duan, L., Xu, L., Francella, N., Sidahmed, A., Smith, A.J., Cramer, E.M.*, et al.* (2009). Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. Journal of Clinical Investigation.

Brenchley, J.M. (2004). CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. Journal of Experimental Medicine *200*, 749-759.

Briggs, J.A.G., and Kräusslich, H.-G. (2011). The Molecular Architecture of HIV. Journal of Molecular Biology *410*, 491-500.

Brown, K.N., Wijewardana, V., Liu, X., and Barratt-Boyes, S.M. (2009). Rapid Influx and Death of Plasmacytoid Dendritic Cells in Lymph Nodes Mediate Depletion in Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. PLoS Pathogens *5*, e1000413.

Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, W., Trkola, A., Purtscher, M., Gruber, G., Tauer, C., Steindl, F., Jungbauer, A.*, et al.* (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. AIDS Res Hum Retroviruses *10*, 359-369.

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

Burton, D.R. (2005). Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. Proceedings of the National Academy of Sciences *102*, 14943-14948.

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

Burton, D.R., Hessell, A.J., Keele, B.F., Klasse, P.J., Ketas, T.A., Moldt, B., Dunlop, D.C., Poignard, P., Doyle, L.A., Cavacini, L., *et al.* (2011). Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 11181-11186.

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

Calarese, D.A. (2003). Antibody Domain Exchange Is an Immunological Solution to Carbohydrate Cluster Recognition. Science *300*, 2065-2071.

Campillo-Gimenez, L., Laforge, M., Fay, M., Brussel, A., Cumont, M.C., Monceaux, V., Diop, O., Levy, Y., Hurtrel, B., Zaunders, J., *et al.* (2009). Nonpathogenesis of Simian Immunodeficiency Virus Infection Is Associated with Reduced Inflammation and Recruitment of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes, Not to Lack of an Interferon Type I Response, during the Acute Phase. Journal of Virology *84*, 1838-1846.

Cao, W., Zhang, L., Rosen, D.B., Bover, L., Watanabe, G., Bao, M., Lanier, L.L., and Liu, Y.-J. (2007). BDCA2/Fc□RIγ Complex Signals through a Novel BCR-Like Pathway in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. PLoS Biology *5*, e248.

Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J.F., and Greene, W.C. (2007). In Vitro Derived Dendritic Cells trans-Infect CD4 T Cells Primarily with Surface-Bound HIV-1 Virions. PLoS Pathogens *3*, e4.

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nat Med *5*, 919-923.

Chaperot, L., Bendriss, N., Manches, O., Gressin, R., Maynadie, M., Trimoreau, F., Orfeuvre, H., Corront, B., Feuillard, J., Sotto, J.J., *et al.* (2001). Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. Blood *97*, 3210-3217.

Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J.P., and Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. J Immunol *176*, 248-255.

Checkley, M.A., Luttge, B.G., and Freed, E.O. (2011). HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. Journal of Molecular Biology *410*, 582-608.

Chehimi, J., Azzoni, L., Farabaugh, M., Creer, S.A., Tomescu, C., Hancock, A., Mackiewicz, A., D'Alessandro, L., Ghanekar, S., Foulkes, A.S., *et al.* (2007). Baseline viral load and immune activation determine the extent of reconstitution of innate immune effectors in HIV-1-infected subjects undergoing antiretroviral treatment. J Immunol *179*, 2642-2650.

Chehimi, J., Papasavvas, E., Tomescu, C., Gekonge, B., Abdulhaqq, S., Raymond, A., Hancock, A., Vinekar, K., Carty, C., Reynolds, G., *et al.* (2009). Inability of Plasmacytoid Dendritic Cells To Directly Lyse HIV-Infected Autologous CD4+ T Cells despite Induction of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. Journal of Virology *84*, 2762-2773.

Chen, K., Huang, J., Zhang, C., Huang, S., Nunnari, G., Wang, F.x., Tong, X., Gao, L., Nikisher, K., and Zhang, H. (2006). Alpha Interferon Potently Enhances the Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity of APOBEC3G in Resting Primary CD4 T Cells. Journal of Virology *80*, 7645-7657.

Chen, P., Hubner, W., Spinelli, M.A., and Chen, B.K. (2007). Predominant Mode of Human Immunodeficiency Virus Transfer between T Cells Is Mediated by Sustained Env-

Dependent Neutralization-Resistant Virological Synapses. Journal of Virology *81*, 12582-12595.

Cicala, C., Martinelli, E., McNally, J.P., Goode, D.J., Gopaul, R., Hiatt, J., Jelicic, K., Kottilil, S., Macleod, K., O'Shea, A.*, et al.* (2009). The integrin 4 7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 20877-20882.

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

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nature Immunology *5*, 1219-1226.

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

de Heer, H.J. (2004). Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. Journal of Experimental Medicine *200*, 89-98.

Decalf, J., Fernandes, S., Longman, R., Ahloulay, M., Audat, F., Lefrerre, F., Rice, C.M., Pol, S., and Albert, M.L. (2007). Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. Journal of Experimental Medicine *204*, 2423-2437.

Deeks, S.G., and Walker, B.D. (2007). Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. Immunity *27*, 406-416.

Demoulin, S., Roncarati, P., Delvenne, P., and Hubert, P. (2012). Production of large numbers of plasmacytoid dendritic cells with functional activities from CD34+ hematopoietic progenitor cells: Use of interleukin-3. Experimental Hematology.

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

Derdeyn, C.A. (2004). Envelope-Constrained Neutralization-Sensitive HIV-1 After Heterosexual Transmission. Science *303*, 2019-2022.

Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sörensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. Nature Immunology *9*, 551-557.

Dillon, S.M., Robertson, K.B., Pan, S.C., Mawhinney, S., Meditz, A.L., Folkvord, J.M., Connick, E., McCarter, M.D., and Wilson, C.C. (2008). Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr *48*, 1-12.

Diop, O.M., Ploquin, M.J.Y., Mortara, L., Faye, A., Jacquelin, B., Kunkel, D., Lebon, P., Butor, C., Hosmalin, A., Barre-Sinoussi, F.*, et al.* (2008). Plasmacytoid Dendritic Cell Dynamics and Alpha Interferon Production during Simian Immunodeficiency Virus Infection with a Nonpathogenic Outcome. Journal of Virology *82*, 5145-5152.

Donaghy, H. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. Blood *101*, 4505-4511.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. Blood *98*, 2574-2576.

Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol *165*, 6037-6046.

Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T.*, et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. J Exp Med *194*, 1823-1834.

Evans, V.A., Lal, L., Akkina, R., Solomon, A., Wright, E., Lewin, S.R., and Cameron, P.U. (2011). Thymic plasmacytoid dendritic cells are susceptible to productive HIV-1 infection and efficiently transfer R5 HIV-1 to thymocytes in vitro. Retrovirology *8*, 43.

Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloser, P., Sun, Y., Megjugorac, N., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2001). Decreased Interferon-α Production in HIV-Infected Patients Correlates with Numerical and Functional Deficiencies in Circulating Type 2 Dendritic Cell Precursors. Clinical Immunology *101*, 201-210.

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

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

Fiebig, E.W., Wright, D.J., Rawal, B.D., Garrett, P.E., Schumacher, R.T., Peddada, L., Heldebrant, C., Smith, R., Conrad, A., Kleinman, S.H.*, et al.* (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. Aids *17*, 1871-1879.

Fiorentini, S., Riboldi, E., Facchetti, F., Avolio, M., Fabbri, M., Tosti, G., Becker, P.D., Guzman, C.A., Sozzani, S., and Caruso, A. (2008). HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 3867-3872.

Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N.W., Herndier, B.G., and Engleman, E.G. (2002). Productive Infection of Plasmacytoid Dendritic Cells with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Triggered by CD40 Ligation. Journal of Virology *76*, 11033-11041.

Fonteneau, J.F., Larsson, M., Beignon, A.S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells and Concomitantly Induces the Bystander Maturation of Myeloid Dendritic Cells. Journal of Virology *78*, 5223-5232.

Forthal, D.N., Landucci, G., and Daar, E.S. (2001). Antibody from Patients with Acute Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection Inhibits Primary Strains of HIV Type 1 in the Presence of Natural-Killer Effector Cells. Journal of Virology *75*, 6953-6961.

Forthal, D.N., and Moog, C. (2009). Fc receptor-mediated antiviral antibodies. Current Opinion in HIV and AIDS *4*, 388-393.

Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annu Rev Biochem *67*, 1-25.

Frankel, S.S., Steinman, R.M., Michael, N.L., Kim, S.R., Bhardwaj, N., Pope, M., Louder, M.K., Ehrenberg, P.K., Parren, P.W., Burton, D.R., *et al.* (1998). Neutralizing monoclonal antibodies block human immunodeficiency virus type 1 infection of dendritic cells and transmission to T cells. J Virol *72*, 9788-9794.

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

Ganesh, L., Leung, K., Lore, K., Levin, R., Panet, A., Schwartz, O., Koup, R.A., and Nabel, G.J. (2004). Infection of Specific Dendritic Cells by CCR5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promotes Cell-Mediated Transmission of Virus Resistant to Broadly Neutralizing Antibodies. Journal of Virology *78*, 11980-11987.

Geijtenbeek, T.B., Engering, A., and Van Kooyk, Y. (2002). DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. J Leukoc Biol *71*, 921-931.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A.M., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., *et al.* (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. Journal of Experimental Medicine *205*, 1621-1634.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nature Reviews Immunology *8*, 594-606.

Goonetilleke, N., Liu, M.K.P., Salazar-Gonzalez, J.F., Ferrari, G., Giorgi, E., Ganusov, V.V., Keele, B.F., Learn, G.H., Turnbull, E.L., Salazar, M.G., *et al.* (2009). The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. Journal of Experimental Medicine *206*, 1253-1272.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med *305*, 1425-1431.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. Immunity *29*, 464-475.

Gray, E.S., Madiga, M.C., Hermanus, T., Moore, P.L., Wibmer, C.K., Tumba, N.L., Werner, L., Mlisana, K., Sibeko, S., Williamson, C., *et al.* (2011). The Neutralization Breadth of HIV-1 Develops Incrementally over Four Years and Is Associated with CD4+ T Cell Decline and High Viral Load during Acute Infection. Journal of Virology *85*, 4828-4840.

Greene, W.C., and Peterlin, B.M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. Nat Med *8*, 673-680.

Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., and Picker, L.J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. Nature Medicine *12*, 289-295.

Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. J Exp Med *185*, 1101-1111.

Gurney, K.B., Colantonio, A.D., Blom, B., Spits, H., and Uittenbogaart, C.H. (2004). Endogenous IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection. J Immunol *173*, 7269-7276.

Haase, A.T. (2005). Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. Nature Reviews Immunology *5*, 783-792.

Haase, A.T. (2011). Early Events in Sexual Transmission of HIV and SIV and Opportunities for Interventions. Annual Review of Medicine *62*, 127-139.

Hansen, S.G., Vieville, C., Whizin, N., Coyne-Johnson, L., Siess, D.C., Drummond, D.D., Legasse, A.W., Axthelm, M.K., Oswald, K., Trubey, C.M.*, et al.* (2009). Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. Nature Medicine *15*, 293-299.

Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 17453-17458.

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

Harris, L.D., Tabb, B., Sodora, D.L., Paiardini, M., Klatt, N.R., Douek, D.C., Silvestri, G., Muller-Trutwin, M., Vasile-Pandrea, I., Apetrei, C.*, et al.* (2010). Downregulation of Robust Acute Type I Interferon Responses Distinguishes Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Infection of Natural Hosts from Pathogenic SIV Infection of Rhesus Macaques. Journal of Virology *84*, 7886-7891.

Haupt, S., Donhauser, N., Chaipan, C., Schuster, P., Puffer, B., Daniels, R.S., Greenough, T.C., Kirchhoff, F., and Schmidt, B. (2008). CD4 Binding Affinity Determines Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Alpha Interferon Production in Plasmacytoid Dendritic Cells. Journal of Virology *82*, 8900-8905.

Haynes, B.F. (2005). Cardiolipin Polyspecific Autoreactivity in Two Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies. Science *308*, 1906-1908.

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

Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends in Molecular Medicine *18*, 182-192.

Herbeuval, J.P., Grivel, J.C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., and Shearer, G.M. (2005a). CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. Blood *106*, 3524-3531.

Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., and Shearer, G.M. (2005b). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 13974-13979.

Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., and Shearer, G.M. (2006). Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 7000-7005.

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

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

Hessell, A.J., Rakasz, E.G., Poignard, P., Hangartner, L., Landucci, G., Forthal, D.N., Koff, W.C., Watkins, D.I., and Burton, D.R. (2009b). Broadly Neutralizing Human Anti-HIV Antibody 2G12 Is Effective in Protection against Mucosal SHIV Challenge Even at Low Serum Neutralizing Titers. PLoS Pathogens *5*, e1000433.

Hladik, F., and McElrath, M.J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. Nature Reviews Immunology *8*, 447-457.

Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., and McElrath, M.J. (2007). Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. Immunity *26*, 257-270.

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

Hoeffel, G., Ripoche, A.-C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.-G., Gannagé, M., and Caillat-Zucman, S. (2007). Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. Immunity *27*, 481-492.

Holl, V., Hemmerter, S., Burrer, R., Schmidt, S., Bohbot, A., Aubertin, A.M., and Moog, C. (2004). Involvement of Fc gamma RI (CD64) in the mechanism of HIV-1 inhibition by polyclonal IgG purified from infected patients in cultured monocyte-derived macrophages. J Immunol *173*, 6274-6283.

Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.M., and Moog, C. (2006a). Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. J Virol *80*, 6177-6181.

Holl, V., Peressin, M., Schmidt, S., Decoville, T., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.M., and Moog, C. (2006b). Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. Blood *107*, 4466-4474.

Holmes, E.C. (2001). On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). Biol Rev Camb Philos Soc *76*, 239-254.

Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005a). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. Nature *434*, 1035-1040.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N.*, et al.* (2005b). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature *434*, 772-777.

Huang, C.c. (2005). Structure of a V3-Containing HIV-1 gp120 Core. Science *310*, 1025-1028.

Huang, C.c., Lam, S.N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S.H., Hussan, S.S.u., Stanfield, R.L., Robinson, J., Sodroski, J., Wilson, I.A.*, et al.* (2007). Structures of the CCR5 N Terminus and of a Tyrosine-Sulfated Antibody with HIV-1 gp120 and CD4. Science *317*, 1930-1934.

Huber, M., and Trkola, A. (2007). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. Journal of Internal Medicine *262*, 5-25.

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

Ito, T. (2006). Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. Blood *107*, 2423-2431.

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2001). Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. J Immunol *166*, 2961-2969.

Izaguirre, A. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. Journal of Leukocyte Biology *74*, 1125-1138.

Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., *et al.* (2009). Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. J Clin Invest *119*, 3544-3555.

Jaehn, P.S., Zaenker, K.S., Schmitz, J., and Dzionek, A. (2008). Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: Antigen-specific activation of T cellsversusproduction of type‐I interferon. European Journal of Immunology *38*, 1822-1832.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol *31*, 3388-3393.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. Immunity *19*, 225-234.

Kamga, I., Kahi, S., Develioglu, L., Lichtner, M., Maranon, C., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Lebon, P., Sinet, M., *et al.* (2005). Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. J Infect Dis *192*, 303-310.

Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., *et al.* (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 7552-7557.

Killian, M.S., Fujimura, S.H., Hecht, F.M., and Levy, J.A. (2006). Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. Aids *20*, 1247-1252.

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

Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M.T., Danquet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Veziret, F., Rouzioux, C., Gluckman, J.C., Chermann, J.C., *et al.* (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. Science *225*, 59-63.

Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. Immunity *16*, 135-144.

Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. Nature *393*, 648-659.

Lambert, A.A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A.D., and Tremblay, M.J. (2008). The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. Blood *112*, 1299-1307.

Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.-X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C.*, et al.* (2009). Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. Aids *23*, 897-906.

Lande, R., and Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. Ann N Y Acad Sci *1183*, 89-103.

Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells. Science *315*, 1398-1401.

Lehmann, C., Harper, J.M., Taubert, D., Hartmann, P., Fatkenheuer, G., Jung, N., van Lunzen, J., Stellbrink, H.J., Gallo, R.C., and Romerio, F. (2008). Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr *48*, 522-530.

Lehmann, C., Lafferty, M., Garzino-Demo, A., Jung, N., Hartmann, P., Fätkenheuer, G., Wolf, J.S., van Lunzen, J., and Romerio, F. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients. PLoS ONE *5*, e11110.

Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M.*, et al.* (2011). Innate sensing of HIV-infected cells. PLoS Pathog *7*, e1001284.

Li, L., Liu, S., Zhang, T., Pan, W., Yang, X., and Cao, X. (2008). Splenic stromal microenvironment negatively regulates virus-activated plasmacytoid dendritic cells through TGF-beta. J Immunol *180*, 2951-2956.

Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J., and Haase, A.T. (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. Nature *434*, 1148-1152.

Li, Q., Estes, J.D., Schlievert, P.M., Duan, L., Brosnahan, A.J., Southern, P.J., Reilly, C.S., Peterson, M.L., Schultz-Darken, N., Brunner, K.G.*, et al.* (2009). Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. Nature *458*, 1034-1038.

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

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell *86*, 367-377.

Liu, Y.-J. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. Annual Review of Immunology *23*, 275-306.

Lopez, C., Fitzgerald, P.A., and Siegal, F.P. (1983). Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon-alpha in vitro associated with severe opportunistic infections. J Infect Dis *148*, 962-966.

Lore, K. (2005). Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. Journal of Experimental Medicine *201*, 2023-2033.

Lund, J.M., Linehan, M.M., Iijima, N., and Iwasaki, A. (2006). Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. J Immunol *177*, 7510-7514.

Machmach, K., Leal, M., Gras, C., Viciana, P., Genebat, M., Franco, E., Boufassa, F., Lambotte, O., Herbeuval, J.P., and Ruiz-Mateos, E. (2012). Plasmacytoid Dendritic Cells Reduce HIV Production in Elite Controllers. Journal of Virology *86*, 4245-4252.

Malleret, B., Maneglier, B., Karlsson, I., Lebon, P., Nascimbeni, M., Perie, L., Brochard, P., Delache, B., Calvo, J., Andrieu, T.*, et al.* (2008). Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. Blood *112*, 4598-4608.

Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., Lifson, J., Chaperot, L., Plumas, J., and Bhardwaj, N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. J Clin Invest *118*, 3431-3439.

Mandl, J.N., Barry, A.P., Vanderford, T.H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F.J., Coffman, R.L., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2008). Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. Nature Medicine *14*, 1077-1087.

Marie, I., Durbin, J.E., and Levy, D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. EMBO J *17*, 6660-6669.

Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., Goode, D.J., Macleod, K., Arthos, J., and Fauci, A.S. (2007). HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- secretion in plasmacytoid dendritic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *104*, 3396-3401.

Martinson, J., Romangonzalez, A., Tenorio, A., Montoya, C., Gichinga, C., Rugeles, M., Tomai, M., Krieg, A., Ghanekar, S., and Baum, L. (2007). Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. Cellular Immunology *250*, 75-84.

Martinson, J.A., Montoya, C.J., Usuga, X., Ronquillo, R., Landay, A.L., and Desai, S.N. (2009). Chloroquine Modulates HIV-1-Induced Plasmacytoid Dendritic Cell Alpha Interferon: Implication for T-Cell Activation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *54*, 871-881.

Mascola, J.R., Lewis, M.G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T.C., Hayes, D., Louder, M.K., Brown, C.R., Sapan, C.V., Frankel, S.S.*, et al.* (1999). Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. J Virol *73*, 4009-4018.

Mascola, J.R., and Montefiori, D.C. (2010). The Role of Antibodies in HIV Vaccines. Annual Review of Immunology *28*, 413-444.

Mascola, J.R., Stiegler, G., VanCott, T.C., Katinger, H., Carpenter, C.B., Hanson, C.E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S.S., Birx, D.L.*, et al.* (2000). Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. Nat Med *6*, 207-210.

Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. Nature *434*, 1093-1097.

McElrath, M.J., and Haynes, B.F. (2010). Induction of Immunity to Human Immunodeficiency Virus Type-1 by Vaccination. Immunity *33*, 542-554.

McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.F. (2009). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. Nature Reviews Immunology *10*, 11-23.

Megjugorac, N.J. (2003). Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. Journal of Leukocyte Biology *75*, 504-514.

Mehandru, S. (2004). Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. Journal of Experimental Medicine *200*, 761-770.

Meier, A., Chang, J.J., Chan, E.S., Pollard, R.B., Sidhu, H.K., Kulkarni, S., Wen, T.F., Lindsay, R.J., Orellana, L., Mildvan, D*., et al.* (2009). Sex differences in the Toll-like receptor–mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. Nature Medicine *15*, 955-959.

Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell *106*, 255-258.

Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacken, P.J., Punt, C.J.A., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- production. Blood *111*, 4245-4253.

Meyers, J.H., Justement, J.S., Hallahan, C.W., Blair, E.T., Sun, Y.A., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottilil, S., Moir, S., Kovacs, C.M*., et al.* (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. PLoS ONE *2*, e458.

Mikell, I., Sather, D.N., Kalams, S.A., Altfeld, M., Alter, G., and Stamatatos, L. (2011). Characteristics of the Earliest Cross-Neutralizing Antibody Response to HIV-1. PLoS Pathogens *7*, e1001251.

Moir, S., Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic Mechanisms of HIV Disease*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease *6*, 223-248.

Moldt, B., Schultz, N., Dunlop, D.C., Alpert, M.D., Harvey, J.D., Evans, D.T., Poignard, P., Hessell, A.J., and Burton, D.R. (2011). A Panel of IgG1 b12 Variants with Selectively Diminished or Enhanced Affinity for Fc Receptors To Define the Role of Effector Functions in Protection against HIV. Journal of Virology *85*, 10572-10581.

Moldt, B., Shibata-Koyama, M., Rakasz, E.G., Schultz, N., Kanda, Y., Dunlop, D.C., Finstad, S.L., Jin, C., Landucci, G., Alpert, M.D*., et al.* (2012). A Nonfucosylated Variant of the anti-HIV-1 Monoclonal Antibody b12 Has Enhanced Fc RIIIa-Mediated Antiviral Activity In Vitro but Does Not Improve Protection against Mucosal SHIV Challenge in Macaques. Journal of Virology *86*, 6189-6196.

Montero, M., van Houten, N.E., Wang, X., and Scott, J.K. (2008). The Membrane-Proximal External Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope: Dominant Site of Antibody Neutralization and Target for Vaccine Design. Microbiology and Molecular Biology Reviews *72*, 54-84.

Moody, M.A., Liao, H.X., Alam, S.M., Scearce, R.M., Plonk, M.K., Kozink, D.M., Drinker, M.S., Zhang, R., Xia, S.M., Sutherland, L.L*., et al.* (2010). Anti-phospholipid human monoclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce -chemokines. Journal of Experimental Medicine *207*, 763-776.

Moog, C., Fleury, H.J., Pellegrin, I., Kirn, A., and Aubertin, A.M. (1997). Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. J Virol *71*, 3734-3741.

Moore, J.P. (1995). HIV vaccines. Back to primary school. Nature *376*, 115.

Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., and Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. Blood *112*, 3713-3722.

Nascimbeni, M., Perie, L., Chorro, L., Diocou, S., Kreitmann, L., Louis, S., Garderet, L., Fabiani, B., Berger, A., Schmitz, J*., et al.* (2009). Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens

from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon- expression. Blood *113*, 6112-6119.

Nawaz, F., Cicala, C., Van Ryk, D., Block, K.E., Jelicic, K., McNally, J.P., Ogundare, O., Pascuccio, M., Patel, N., Wei, D.*, et al.* (2011). The Genotype of Early-Transmitting HIV gp120s Promotes α4β7 –Reactivity, Revealing α4β7+/CD4+ T cells As Key Targets in Mucosal Transmission. PLoS Pathogens *7*, e1001301.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nature Reviews Immunology *8*, 34-47.

Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J.P., Mammano, F., and Schwartz, O. (2005). Covert Human Immunodeficiency Virus Replication in Dendritic Cells and in DC-SIGN-Expressing Cells Promotes Long-Term Transmission to Lymphocytes. Journal of Virology *79*, 5386-5399.

O'Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Jimenez Baranda, S., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D.*, et al.* (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN-α–producing and partially matured phenotype. Journal of Clinical Investigation *121*, 1088-1101.

Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y.*, et al.* (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. Nature Immunology *7*, 652-662.

Otero, M., Nunnari, G., Leto, D., Sullivan, J., Wang, F.X., Frank, I., Xu, Y., Patel, C., Dornadula, G., Kulkosky, J.*, et al.* (2003). Peripheral blood Dendritic cells are not a major reservoir for HIV type 1 in infected individuals on virally suppressive HAART. AIDS Res Hum Retroviruses *19*, 1097-1103.

Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., and Hosmalin, A. (2001). Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. Blood *98*, 3016-3021.

Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y.E.A., Chen, L., Huang, C.c., Kong, L., Kwon, Y.D., Stuckey, J., Zhou, T., Robinson, J.E.*, et al.* (2009). Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 1166-1171.

Pantophlet, R., and Burton, D.R. (2006). GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. Annual Review of Immunology *24*, 739-769.

Parren, P.W.H.I., Marx, P.A., Hessell, A.J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J.P., and Burton, D.R. (2001). Antibody Protects Macaques against Vaginal Challenge with a Pathogenic R5 Simian/Human Immunodeficiency Virus at Serum Levels Giving Complete Neutralization In Vitro. Journal of Virology *75*, 8340-8347.

Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J., and Gotch, F. (2001). Plasmacytoid Dendritic Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Release Infectious Virus. Journal of Virology *75*, 6710-6713.

Pejchal, R., Doores, K.J., Walker, L.M., Khayat, R., Huang, P.S., Wang, S.K., Stanfield, R.L., Julien, J.P., Ramos, A., Crispin, M.*, et al.* (2011). A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. Science *334*, 1097-1103.

Peng, G., Lei, K.J., Jin, W., Greenwell-Wild, T., and Wahl, S.M. (2006). Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. J Exp Med *203*, 41-46.

Penna, G., Sozzani, S., and Adorini, L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. J Immunol *167*, 1862-1866.

Peressin, M., Holl, V., Schmidt, S., Decoville, T., Mirisky, D., Lederle, A., Delaporte, M., Xu, K., Aubertin, A.M., and Moog, C. (2011). HIV-1 replication in Langerhans and interstitial dendritic cells is inhibited by neutralizing and Fc-mediated inhibitory antibodies. J Virol *85*, 1077-1085.

Perez, L.G., Costa, M.R., Todd, C.A., Haynes, B.F., and Montefiori, D.C. (2009). Utilization of Immunoglobulin G Fc Receptors by Human Immunodeficiency Virus Type 1: a Specific Role for Antibodies against the Membrane-Proximal External Region of gp41. Journal of Virology *83*, 7397-7410.

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

Piacentini, L., Biasin, M., Fenizia, C., and Clerici, M. (2009). Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. Journal of Internal Medicine *265*, 110-124.

Piguet, V., and Sattentau, Q. (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. J Clin Invest *114*, 605-610.

Piguet, V., and Steinman, R.M. (2007). The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. Trends in Immunology *28*, 503-510.

Plotkin, S.A. (2010). Correlates of Protection Induced by Vaccination. Clinical and Vaccine Immunology *17*, 1055-1065.

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

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

Pritschet, K., Donhauser, N., Schuster, P., Ries, M., Haupt, S., Kittan, N.A., Korn, K., Pöhlmann, S., Holland, G., Bannert, N.*, et al.* (2012). CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. Virology *423*, 152-164.

Ratner, L., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1985). HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. Nature *313*, 636-637.

Reizis, B. (2010). Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. Current Opinion in Immunology *22*, 206-211.

Richman, D.D. (2003). Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. Proceedings of the National Academy of Sciences *100*, 4144-4149.

Rodriguez, B., Lederman, M.M., Jiang, W., Bazdar, D.A., Garate, K., Harding, C.V., and Sieg, S.F. (2006). Interferon-alpha differentially rescues CD4 and CD8 T cells from apoptosis in HIV infection. Aids *20*, 1379-1389.

Rodriguez Rodrigues, C., Cabrini, M., Remes Lenicov, F., Sabatté, J., Ceballos, A., Jancic, C., Raiden, S., Ostrowski, M., Silberstein, C., and Geffner, J. (2011). Epithelial Cells Activate Plasmacytoid Dendritic Cells Improving Their Anti-HIV Activity. PLoS ONE *6*, e28709.

Ruppach, H., Nara, P., Raudonat, I., Elanjikal, Z., Rubsamen-Waigmann, H., and Dietrich, U. (2000). Human immunodeficiency virus (HIV)-positive sera obtained shortly after seroconversion neutralize autologous HIV type 1 isolates on primary macrophages but not on lymphocytes. J Virol *74*, 5403-5411.

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

Sabado, R.L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K.V.*, et al.* (2010). Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. Blood *116*, 3839-3852.

Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Keele, B.F., Learn, G.H., Giorgi, E.E., Li, H., Decker, J.M., Wang, S., Baalwa, J., Kraus, M.H.*, et al.* (2009). Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. Journal of Experimental Medicine *206*, 1273-1289.

Sanders, R.W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K.O., Kwong, P.D., and Moore, J.P. (2002). The Mannose-Dependent Epitope for Neutralizing Antibody 2G12 on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp120. Journal of Virology *76*, 7293-7305.

Sather, D.N., Armann, J., Ching, L.K., Mavrantoni, A., Sellhorn, G., Caldwell, Z., Yu, X., Wood, B., Self, S., Kalams, S.*, et al.* (2008). Factors Associated with the Development of Cross-Reactive Neutralizing Antibodies during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Journal of Virology *83*, 757-769.

Sato, M. (2000). Disticnt and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN gene induction. Immunity *13*, 539-548.

Scarlatti, G., Tresoldi, E., Bjorndal, A., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H.K., Malnati, M.S., Plebani, A., Siccardi, A.G., Littman, D.R.*, et al.* (1997). In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. Nat Med *3*, 1259-1265.

Schmidt, B. (2004). Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: onset of cytopathic effects and cell death after PDC maturation. Virology.

Schmidt, B., Ashlock, B.M., Foster, H., Fujimura, S.H., and Levy, J.A. (2005). HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. Virology *343*, 256-266.

Sedaghat, A.R., German, J., Teslovich, T.M., Cofrancesco, J., Jie, C.C., Talbot, C.C., and Siliciano, R.F. (2007). Chronic CD4+ T-Cell Activation and Depletion in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Type I Interferon-Mediated Disruption of T-Cell Dynamics. Journal of Virology *82*, 1870-1883.

Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M.W., and Martin, M.A. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. Nat Med *5*, 204-210.

Siegal, F.P. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. Science *284*, 1835-1837.

Siegal, F.P., Fitzgerald-Bocarsly, P., Holland, B.K., and Shodell, M. (2001). Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. Aids *15*, 1603-1612.

Siegal, F.P., Lopez, C., Fitzgerald, P.A., Shah, K., Baron, P., Leiderman, I.Z., Imperato, D., and Landesman, S. (1986). Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome

result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. J Clin Invest *78*, 115-123.

Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B.R.*, et al.* (1981). Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. N Engl J Med *305*, 1439-1444.

Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miiro, G.*, et al.* (2009). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Neutralizers: Individuals with Broad and Potent Neutralizing Activity Identified by Using a High-Throughput Neutralization Assay together with an Analytical Selection Algorithm. Journal of Virology *83*, 7337-7348.

Skillman, D.R., Malone, J.L., Decker, C.F., Wagner, K.F., Mapou, R.L., Liao, M.J., Testa, D., and Meltzer, M.S. (1996). Phase I trial of interferon alfa-n3 in early-stage human immunodeficiency virus type 1 disease: evidence for drug safety, tolerance, and antiviral activity. J Infect Dis *173*, 1107-1114.

Smed-Sorensen, A., Lore, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.L., and Koup, R.A. (2005). Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. Journal of Virology *79*, 8861-8869.

Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J.A., and Liu, Y.J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. Blood *98*, 906-912.

Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D.R., and Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? Nature Medicine.

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem *67*, 227-264.

Stary, G., Klein, I., Kohlhofer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Mullauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., and Stingl, G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. Blood *114*, 3854-3863.

Stoiber, H., Banki, Z., Wilflingseder, D., and Dierich, M.P. (2008). Complement–HIV interactions during all steps of viral pathogenesis. Vaccine *26*, 3046-3054.

Strebel, K., Luban, J., and Jeang, K.-T. (2009). Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. BMC Medicine *7*, 48.

Tavel, J.A., Huang, C.-Y., Shen, J., Metcalf, J.A., Dewar, R., Shah, A., Vasudevachari, M.B., Follmann, D.A., Herpin, B., Davey, R.T.*, et al.* (2010). Interferon-α Produces Significant Decreases in HIV Load. Journal of Interferon & Cytokine Research *30*, 461-464.

Tebit, D.M., and Arts, E.J. (2011). Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. Lancet Infect Dis *11*, 45-56.

Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol *2*, 569-579.

Tilton, J.C., Manion, M.M., Luskin, M.R., Johnson, A.J., Patamawenu, A.A., Hallahan, C.W., Cogliano-Shutta, N.A., Mican, J.M., Davey, R.T., Kottilil, S.*, et al.* (2008). Human Immunodeficiency Virus Viremia Induces Plasmacytoid Dendritic Cell Activation In Vivo and Diminished Alpha Interferon Production In Vitro. Journal of Virology *82*, 3997-4006.

Tomaras, G.D., Yates, N.L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G.G., Chavez, L.L., Decamp, A.C., Parks, R.J., Ashley, V.C., Lucas, J.T., *et al.* (2008). Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. Journal of Virology *82*, 12449-12463.

Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P., and Katinger, H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. J Virol *70*, 1100-1108.

Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. J Mol Biol *285*, 1-32.

Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pöhlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. Nature Immunology *3*, 975-983.

Turville, S.G., Santos, J.J., Frank, I., Cameron, P.U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr., *et al.* (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. Blood *103*, 2170-2179.

Van Grevenynghe, J., Cubas, R.A., Noto, A., DaFonseca, S., He, Z., Peretz, Y., Filali-Mouhim, A., Dupuy, F.P., Procopio, F.A., Chomont, N., Balderas, R.S., Said, E.A., Boulassel, M.R., Tremblay, C.L., Routy, J.P., Sékaly, R.P., and Haddad E.K. (2011). Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. The Journal of Clinical Investigation *121*, 3877-3888.

Verkoczy, L., Kelsoe, G., Moody, M.A., and Haynes, B.F. (2011). Role of immune mechanisms in induction of HIV-1 broadly neutralizing antibodies. Current Opinion in Immunology *23*, 383-390.

Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. Immunity *29*, 352-361.

Wain-Hobson, S., Alizon, M., and Montagnier, L. (1985). Relationship of AIDS to other retroviruses. Nature *313*, 743.

Walker, L.M., and Burton, D.R. (2010). Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. Current Opinion in Immunology *22*, 358-366.

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

Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., Wrin, T., Simek, M.D., Fling, S., Mitcham, J.L., *et al.* (2009). Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target. Science *326*, 285-289.

Wang, F.x., Huang, J., Zhang, H., and Ma, X. (2008). APOBEC3G upregulation by alpha interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. Journal of General Virology *89*, 722-730.

Weber, J. (2001). The pathogenesis of HIV-1 infection. Br Med Bull *58*, 61-72.

Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., *et al.* (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature *422*, 307-312.

Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., and Forster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 6347-6352.

West, A.P., Galimidi, R.P., Foglesong, C.P., Gnanapragasam, P.N.P., Huey-Tubman, K.E., Klein, J.S., Suzuki, M.D., Tiangco, N.E., Vielmetter, J., and Bjorkman, P.J. (2008). Design and Expression of a Dimeric Form of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody 2G12 with Increased Neutralization Potency. Journal of Virology *83*, 98-104.

Wiley, R.D. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 738-743.

Worobey, M., Telfer, P., Souquiere, S., Hunter, M., Coleman, C.A., Metzger, M.J., Reed, P., Makuwa, M., Hearn, G., Honarvar, S.*, et al.* (2010). Island biogeography reveals the deep history of SIV. Science *329*, 1487.

Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. Nature Reviews Immunology *6*, 859-868.

Wu, L., and Liu, Y.-J. (2007). Development of Dendritic-Cell Lineages. Immunity *26*, 741-750.

Wu, X., Yang, Z.Y., Li, Y., Hogerkorp, C.M., Schief, W.R., Seaman, M.S., Zhou, T., Schmidt, S.D., Wu, L., Xu, L.*, et al.* (2010). Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1. Science *329*, 856-861.

Wyatt, R. (1998). The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. Science *280*, 1884-1888.

Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., and Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Nature *393*, 705-711.

Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O'Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M.*, et al.* (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. Nature Immunology *9*, 1244-1252.

Yu, H.J., Reuter, M.A., and McDonald, D. (2008). HIV Traffics through a Specialized, Surface-Accessible Intracellular Compartment during trans-Infection of T Cells by Mature Dendritic Cells. PLoS Pathogens *4*, e1000134.

Zhang, Z. (1999). Sexual Transmission and Propagation of SIV and HIV in Resting and Activated CD4+ T Cells. Science *286*, 1353-1357.

Zhou, T., Georgiev, I., Wu, X., Yang, Z.Y., Dai, K., Finzi, A., Do Kwon, Y., Scheid, J.F., Shi, W., Xu, L.*, et al.* (2010). Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of HIV-1 by Antibody VRC01. Science *329*, 811-817.

Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessell, A.J., Van Ryk, D., Xiang, S.-H., Yang, X., Zhang, M.-Y., Zwick, M.B., Arthos, J.*, et al.* (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. Nature *445*, 732-737.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J.D., Grisé, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature *441*, 847-852.

Zhu, P., Winkler, H., Chertova, E., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2008). Cryoelectron Tomography of HIV-1 Envelope Spikes: Further Evidence for Tripod-Like Legs. PLoS Pathogens *4*, e1000203.

Zolla-Pazner, S., and Cardozo, T. (2010). Structure–function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. Nature Reviews Immunology *10*, 527-535.

Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R., *et al.* (2001). Broadly Neutralizing Antibodies Targeted to the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp41. Journal of Virology *75*, 10892-10905.

Alexandre LEDERLE

# Infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes par le VIH : Mécanisme d'inhibition par les anticorps et étude des modifications fonctionnelles


## Résumé

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont infectées par le VIH-1 et la diminution de leur nombre dans la circulation sanguine est corrélée avec la virémie des patients. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons montré que les anticorps neutralisants (AcN) spécifiques du VIH-1 inhibent l'infection des pDC par des isolats primaires de VIH-1. Contrairement aux mDC, le mécanisme d'inhibition de l'infection des pDC est indépendant du RFcγII présent à leur surface. En parallèle, nos résultats indiquent que les pDC produisent de l'interféron-α et d'autres cytokines et chimiokines en réponse au VIH-1, même lorsque l'infection des cellules est inhibée par les AcN. Enfin, nous avons observé l'inhibition du transfert en cis et en trans du VIH-1 des pDC aux lymphocytes T CD4 par les AcN.

Dans un contexte d'induction d'AcN par vaccination, l'inhibition de la réplication du VIH-1 dans les pDC associé au maintien de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire par ces cellules pourrait favoriser l'élimination du virus et ralentir sa dissémination dans l'organisme.


Mots clés : VIH-1, anticorps neutralisants, cellules dendritiques plasmacytoïdes, interféron-α, transfert


## Résumé en anglais

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are able to replicate HIV-1, and the decrease of pDC number in blood is correlated with HIV-1 viremia in patients. During my thesis, we showed that HIV-1-specific neutralizing antibodies (NAb) inhibited the infection of pDC by HIV-1primary isolates. Unlike mDC, the mechanism of inhibition of pDC infection was independent of FcγRII expressed on these cells. In parallel, our results indicated that pDC produce interferon-α and other cytokines and chemokines in response to HIV-1, even when HIV-1 infection of these cells was inhibited by NAb. Finally, we showed that NAb were able to inhibit HIV-1 transfer in *cis* and *trans* from pDC to CD4 T cells.

In the context of antibodies induction by vaccination, the inhibition of HIV-1 replication in pDC associated with the maintenance of pro-inflammatory cytokines released by these cells may help to eliminate the virus and impede its dissemination in the body.


Keywords : HIV-1, neutralizing antibodies, plasmacytoid dendritic cells, interferon-α, transfer