

Table des matières

Résumé	9
Abstract.....	10
Abréviation.....	11
Introduction : Vaccination VIH	13
1. Physiopathologie et traitement du VIH.....	13
1.1. Généralités, enjeux, difficultés	13
1.1.1. Structure du VIH.....	15
1.1.2. Diversité génétique du VIH	16
1.1.3. Différents groupes.....	17
1.2. Transmission et cibles.....	18
1.2.1. Voies de transmission.....	18
1.2.2. Cibles cellulaires.....	19
1.3. Etapes de l'infection cellulaire par Env	20
1.3.1. Infection.....	20
1.3.2. Cycle de réplication viral.....	21
1.3.3. Dissémination et constitution du réservoir	22
1.3.4. Epuisement des LT.....	23
1.4. Mécanismes d'échappement au contrôle de l'infection	24
1.4.1. Propriétés structurales	24
1.4.2. Pression sélective	25
1.5. Evolution de l'infection : phases et prédition	26
1.5.1. Primo-infection	26
1.5.2. SIDA	28
1.5.3. Prédition de l'évolution de l'infection	28
1.6. Détection et traitement.....	29
1.6.1. Détection	29
1.6.2. Traitement	30
1.7. Paramètres génétiques associés à la protection chez les patients VIH+	31
2. Développement d'un vaccin préventif contre le VIH.....	33
2.1. Généralités sur la vaccination.....	33

2.2.	Orientation d'une réponse immunitaire adaptative.....	35
2.2.1.	Réponse cellulaire	35
2.2.2.	Réponse humorale	36
2.2.3.	Réponse Anticorps neutralisants contre le VIH	37
2.3.	Types de vaccins.....	39
2.3.1.	Vaccin tué ou inactivé	39
2.3.2.	Vaccin vivant atténué	39
2.3.3.	Vaccin à vecteur viral.....	40
2.3.4.	Vaccin sous-unitaire	41
2.3.1.	Vaccin à base d'acides nucléiques	41
2.4.	Différentes phases de validation d'un vaccin et corrélats de protection	43
2.4.1.	Modèles précliniques d'étude du VIH	43
2.4.2.	Phases des essais cliniques	44
2.4.1.	Essais cliniques anti-VIH	44
2.4.2.	RV144 (la cohorte THAI)	45
2.4.3.	Corrélats de protection	45
2.5.	Antigène.....	47
2.5.1.	Objectif : diriger la réponse anticorps.....	49
2.5.2.	Motif 3S	49
2.5.3.	Carrier	54
2.6.	Formulation du vaccin	55
2.6.1.	Objectifs.....	55
2.6.2.	Diversité des adjuvants	56
2.6.3.	Alum, sel d'aluminium, hydroxyde d'aluminium	60
2.6.4.	Emulsion huile dans l'eau à base de squalène, AddaVax TM , MF-59 [®] , SQE	61
2.7.	Modalités d'administration	62
2.7.1.	Différentes voies d'administration vaccinale	62
2.7.2.	Cinétique d'injection	63
3.	Réponse humorale aux vaccins protéiques induisant des AcN	65
3.1.	Réponse humorale	65
3.2.	Réponse innée au site d'injection	67
3.2.1.	Recrutement et activation cellulaire au site d'injection	68

3.2.2. Prise en charge de l'antigène, maturation et migration vers les GLD	72
3.3. Interface entre la réponse innée et acquise dans les GLD	73
3.3.1. Apprêttement et présentation de l'antigène.....	74
3.3.2. Activation et différenciation des LT en Tfh.....	76
3.3.3. Activation des LB	80
3.4. La réaction du centre germinatif des OLII	81
3.4.1. Phase extra-folliculaire et formation du CG	82
3.4.2. Centre Germinatif	82
3.4.3. Zone claire : interaction LB-Tfh et sélection clonale.....	83
3.4.4. Zone sombre : maturation des LB	84
3.5. Mémoire	85
3.5.1. Devenir des LT.....	85
3.5.2. Devenir des LB.....	86
Hypothèses et Objectifs.....	91
Résultats.....	93
1. Réponse adaptative : article	93
2. Réponse innée : Résultats supplémentaires.....	129
Discussion – Conclusion	139
Maturation des LB	140
Caractéristiques des anticorps	141
Effet dépôt	142
Recrutement cellulaire au site d'injection	143
Prise en charge de l'antigène	145
Transport de l'antigène vers les GLD.....	145
Activation des neutrophiles	146
Impact de la déplétion des neutrophiles sur la réponse humorale	147
Conclusion	149
Annexe 1	151
Bibliographie	163

Résumé

Le VIH-1 est à l'origine d'une pandémie contre laquelle aucun vaccin n'existe malgré plus de 30 ans de recherche. L'étude des mécanismes de défense développés par des patients qui contrôlent mieux l'infection est très importante pour définir des stratégies de vaccination efficaces et endiguer la pandémie. L'induction d'anticorps neutralisants (AcN) à large spectre est une piste attrayante pour contrôler l'infection VIH-1. Cependant, l'induction d'AcN nécessite de stimuler le système immunitaire avec un antigène conservé et d'induire une maturation des lymphocytes B spécifique. Les capacités de recombinaison, le fort taux de mutation et la conformation de l'unique protéine de surface Env sont responsables de la difficulté à trouver des antigènes cibles pour la vaccination. L'amélioration de la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires des adjuvants pourrait permettre d'améliorer les stratégies vaccinales.

Nous proposons un vaccin candidat contre le VIH-1 composé du peptide W614A-3S-KLH formulé avec un adjuvant Squalene permettant l'induction d'une réponse humorale capable de neutraliser un large éventail de souches du VIH-1. Il est intéressant de noter que la formulation de ce même peptide avec un adjuvant Alum induit des anticorps incapables de neutraliser des souches sensibles à la neutralisation. Cette dichotomie de qualité de la réponse humorale entre deux adjuvant nous a permis d'étudier les réponses adaptatives et innées qui conduisent à la production d'AcN. Nous avons observé que la formulation Squalene favorise la réaction du centre germinatif et induit une maturation différente des LB par rapport à l'Alum. La formulation Squalene induit également un recrutement précoce et intense de neutrophiles dans les ganglions lymphatiques drainants et au site d'injection. Ces neutrophiles sont activés différemment en fonction de l'adjuvant utilisé mais leur rôle ne s'est pas avéré déterminant pour l'induction d'une réponse humorale.

Le vaccin candidat W614A-3S a confirmé le pouvoir des AcN pour le développement d'un vaccin efficace contre le VIH-1. Ce modèle a également participé à renforcer et étendre les connaissances concernant l'impact d'une formulation Squalene sur les réponses innées et adaptatives pour l'induction d'AcN.

Mots clés : vaccin VIH-1, anticorps neutralisants à large spectre, centre germinatif

Abstract

HIV-1 is the source of a pandemic against which no vaccine exists despite more than 30 years of research. The study of the defense mechanisms developed by patients more resistant to infection is very important to define effective vaccination strategies and to contain the pandemic. The induction of broadly neutralizing antibodies (NAb) is attractive to control HIV-1 infection. But, the induction of NAb requires to stimulate the immune system with a stored antigen and to induce a specific maturation of B cells. The recombinant capacities, the high rate of mutation and the conformation of the unique surface protein Env are responsible for the difficulty in finding target antigens for vaccination. Improving our understanding of the cellular and molecular mechanisms of adjuvants could help to improve HIV vaccine strategies.

We provide a candidate vaccine against HIV-1 composed of the peptide W614A-3S-KLH formulated with a Squalene adjuvant allowing the induction of a humoral response capable of neutralizing a large range of HIV-1 strains. It is interesting to note that the formulation of this same peptide with an Alum adjuvant induces antibodies which are incapable of neutralizing strains sensitive to neutralization. This quality dichotomy of the humoral response between two adjuvants has allowed us to study the adaptive and innate responses that lead to the production of AcN. We have observed that the Squalene formulation promotes the reaction of the germinal center and induces a different maturation of LB compared to Alum. The Squalene formulation also induces early and intense recruitment of neutrophils to the draining lymph nodes and to the injection site. These neutrophils are activated differently depending on the adjuvant used, but their role has not been shown to be critical in inducing a humoral response.

The vaccine candidate W614A-3S has confirmed the power of NAb for the development of an effective vaccine against HIV-1. This model has also helped to enhance and expand knowledge about the impact of a Squalene formulation on innate and adaptive responses for the induction of NAb.

Keywords : HIV-1 vaccine, broadly neutralizing antibodies, germinal center

Abréviation

AcN : Anticorps Neutralisant

Ad / Ad5 : Adénovirus / de sérotype 5

ADCC : Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps

ADCP : Phagocytose à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps

ALT : Asymptomatique à Long Terme

BCR : « B Cell Receptor » : récepteur des lymphocytes B

CD : Cluster de Différenciation

CDC : Cytotoxicité Dépendant du Complément

CDR : Régions Déterminant de Complémentarité

CG : Centre Germinatif

CMH I / CMH II : Complexe Majeur Histocompatibilité de classe I / de classe II

CMV : CytoMégaloVirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CRM : toxine diptérique détoxifiée

DC : « Dendritic Cell » : Cellule Dendritique

EC : « Elite Controler » : Contrôler Elite

FcR / Fc : Récepteur au Fragment Cristallisable

FDC : Cellule Dendritique Folliculaire

GLD : Ganglion Lymphatique Drainant

HEV : « High Endothelial Venule » : vaisseau sanguin dans les ganglions lymphatiques

HLA : « Human Leukocyte Antigen » : antigènes des leucocytes humains

HMS : Hyper Mutation Somatique

HSH : Hommes ayant des rapports Sexuels avec des Hommes

ID : IntraDermique

IM : Intra-Musculaire

IST : Infection Sexuellement Transmissible

KLH : hémocyanine de patelle géante

LB : Lymphocyte B

LPS : LipiPolySaccharide

LT : Lymphocyte T

LTNP : « Long Term Non Progressor » : Non Progresseur à Long Terme

MO : Moelle Osseuse

MPLA : « MonoPhosphoryl Lipid A »

NK : « Natural Killer » : cellule tueuse

OLI : Organe Lymphoïde primaire

OLII : Organe Lymphoïde secondaire

OVA : ovalbumine

PAMP : « Pathogen Associated Molecular Patterns » : motif moléculaire associés aux agents pathogènes

PRR : « Pattern Recognition Receptor » : récepteurs de reconnaissance de motif moléculaire

RAG : Gène d'Activation de la Recombinaison

RSS : Séquences-Signal de Recombinaison

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéfice Acquise

TCR « T Cell Receptor » : récepteur des lymphocytes T

Tfh : lymphocyte T « follicular helper » : auxiliaire folliculaire

Th : lymphocyte T « helper » : auxiliaire

TLR : « Toll-like Receptor » : récepteur Toll-Like

VIH : Virus de l'Immunodéfice Humaine

Introduction : Vaccination VIH

1. Physiopathologie et traitement du VIH

1.1. Généralités, enjeux, difficultés

Bien qu'il existe 2 types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2, dans l'ensemble de ce manuscrit, je me suis intéressée uniquement au VIH-1, responsable de la pandémie. Le VIH-1 est plus répandu (98% des infections VIH d'après l'Inserm) et plus pathogène. Veuillez comprendre VIH-1 dès qu'il sera fait mention du VIH. Dans cette première partie, je vais rappeler des généralités sur les connaissances actuelles à propos du VIH.

Tous les VIH infectant l'espèce humaine dérivent des virus de l'immunodéficience simienne (Gao et al., 1999). L'Homme a pu être infecté après de multiples exposition à du sang contaminé, à des blessures ou des morsures lors de la chasse et du braconnage de différentes espèces de singe infectés en Afrique intertropicale (Peeters et al., 2002; Zhu et al., 1998).

En dépit de son origine Africaine, le premier cas de SIDA a été observé en 1981 aux Etats-Unis et deux ans plus tard, la française Françoise Barré-Sinoussi (Barre-Sinoussi et al., 1983; Greene, 2007) décrit pour la première fois le VIH-1 à l'Institut Pasteur dans le laboratoire de Luc Montagnier. Les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) ont été les premières victimes recensées de l'épidémie lors de son apparition en occident suivis par les utilisateurs de drogues injectables.

Depuis, un très grand nombre d'études ont portées sur les mécanismes d'infection et sur la pathogénèse du virus. Cette infection se traduit principalement par la déplétion rapide des lymphocytes T (LT) CD4+ jusqu'à la perte de l'immunité à médiation cellulaire, entraînant une sensibilisation aux infections opportunistes et aux cancers.

Ces 40 années de recherche ont permis le développement de traitements antirétroviraux efficaces dans le contrôle de l'infection VIH permettant de diminuer la mortalité chez les personnes infectées et traitées mais ils restent contraignants. Ces traitements permettent seulement de contrôler la charge virale à un niveau indétectable (ou très bas) et non pas une guérison des personnes infectées. Ces traitements doivent être pris à vie pour maintenir le contrôle de l'infection. De plus, ils ont un certain coût (soit pour le patient directement, soit

pour le pays s'il est remboursé) et ne sont pas toujours accessible aux populations, notamment dans les pays en voie de développement (Figure 1). Sans traitement, la durée moyenne de survie est estimée entre 9 et 11 ans.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2019, l'infection par le VIH touchait 38 millions de personnes dans le monde et était responsable de 690 000 décès en une année, soit plus que la population du Luxembourg. En comparaison, le virus du SarsCov-2, responsable de la pandémie de Covid-19 qui paralyse le monde depuis un an et demi, était responsable de la mort de plus de 4 000 000 personnes à travers le monde en date du 1 septembre 2021 soit 20 mois après son apparition.

Dans de nombreux pays développés, malgré l'adoption de comportements de protection individuelle comme la généralisation du préservatif, les nouvelles générations ont tendance à négliger le risque de contracter le virus. En 2019, au moins 6 300 Français ont été infectés par le VIH. Le VIH est donc un problème majeur de santé publique, et plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Ces pays sont les plus touchés, 70% des cas d'infection VIH sont recensés en Afrique sub-saharienne, et la prévalence du VIH est bien supérieure à celle des pays développés.



Figure 1 : Distribution des personnes infectées par le VIH-1 dans le monde.

Carte représentant le nombre de personnes vivant avec le VIH (PV VIH), le nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH, le nombre personnes infectées par VIH décédées et le nombre de personnes ayant accès aux traitements contre le VIH en fonction des zones géographiques mentionnées (Musumeci et al., 2015).

Pour endiguer la pandémie la solution la plus efficace serait la vaccination préventive. Seulement, malgré plusieurs décennies de recherche, il n'existe à ce jour aucun vaccin efficace contre le VIH.

1.1.1. Structure du VIH

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus du genre lentivirus. Comme tous les virus, le VIH est un parasite intracellulaire obligatoire avec une architecture rudimentaire qui a besoin de la machinerie cellulaire de la cellule hôte pour se répliquer.

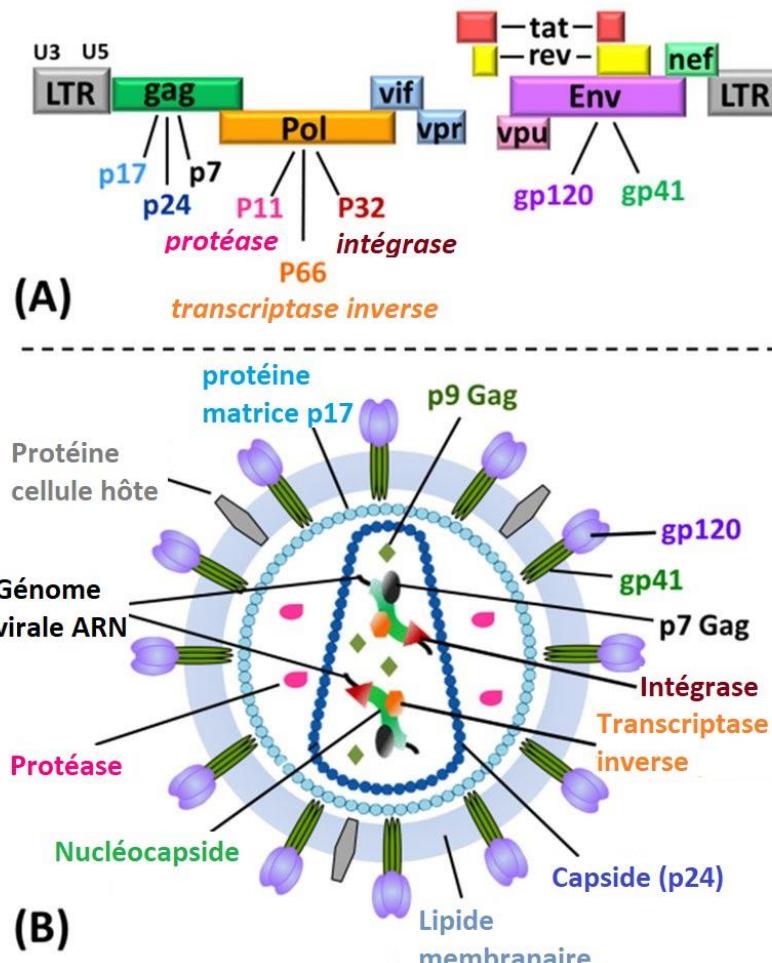


Figure 2 : Schéma des principaux composants du VIH.

Schémas du génome (A) et de la structure (B) de la particule virale du VIH-1 traduit à partir de (Musumeci et al., 2015).

Le génome du VIH a une taille d'environ 9,8Kb et est composé de deux molécules d'ARN simple brin protégées par une assemblage de protéines p24, la capsid (Turner and Summers, 1999; Wain-Hobson et al., 1985). Son génome comporte neufs gènes qui codent les protéines qui composent le virus. Les gènes *gag*, *pol* et *env* sont des gènes classiques des

rétrovirus. Ces trois gènes principaux codent des précurseurs polypeptidiques composées de sous-unités. Les protéines de structure (capside, matrice, nucléocapside) sont codées par le gène *gag* et les enzymes virales (transcriptase inverse, protéase et intégrase) sont codées par le gène *pol*. Ces protéines sont donc synthétisées en tant que polyprotéines à partir d'un unique ARN messager. Ces polyprotéines doivent ensuite être clivées par la protéase virale pour aboutir à des protéines fonctionnelles. Le gène *env* code quant à lui la glycoprotéine d'enveloppe gp160 qui sera par la suite clivée en deux glycoprotéines distinctes, la gp120 et la gp41 par une protéase cellulaire lors de l'infection des cellules hôtes (Figure 2). Les six autres gènes, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*, sont dits « auxiliaires » et codent des facteurs de régulation de l'expression des gènes viraux et de la réPLICATION virale.

Le génome du VIH forme un complexe avec des protéines de la nucléocapside p7 dans la capsid pour stabiliser l'ARN virale. Les virions sont enveloppés d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellules hôte et forme une sphère d'environ 100nm de diamètre dans laquelle la glycoprotéine d'enveloppe du virus Env est stabilisée dans la membrane grâce à l'interaction avec la protéine de la matrice p17 (Figure 2). L'interaction de Env avec le CD4 ainsi qu'un corécepteur exprimé à la surface des cellules cibles permet leur infection.

1.1.2. Diversité génétique du VIH

La transcriptase inverse est la principale source de diversité VIH au sein des individus infectés. Cette diversité permet au VIH d'échapper au contrôle immunitaire en s'adaptant aux contraintes imposées par l'hôte. Cette enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante qui permet de rétro-transcrire l'ARN viral simple brin en ADN double brin. Cependant, cette enzyme est dépourvu de mécanisme de correction des erreurs de rétrotranscription (Roberts et al., 1988). Une erreur d'incorporation survient en moyenne tous les 10000 nucléotides (Abram et al., 2014). 9200 nucléotides composent le génome du VIH. De ce fait, à chaque cycle viral, une mutation est incorporée dans le génome du VIH (Huang and Wooley, 2005). Bien que les mutations soient présentes aléatoirement dans les différentes régions du VIH, seules les mutations n'apportant pas un désavantage pour l'infection sont transmises lors de la propagation du virus. Par exemple, pour la protéine Env, une mutation dans une région responsable de la conformation ou de l'adhésion aux cellules CD4+ rendrait le virion inapte à infecter des cellules CD4+. Ces régions sont donc très

conservées (régions constantes C1-C5 de gp120) alors que d'autres sont plus sujettes aux mutations (régions variables V1-V5 de gp120) (Checkley et al., 2011).

De plus, les génomes de deux souches suffisamment éloignées génétiquement peuvent se recombiner lors de l'infection d'une cellule par deux souches différentes (Tebit et al., 2007). Dans ce cas, une molécule d'ARN génomique de chacune des souches se retrouve dans la même particule virale. La transcriptase inverse peut changer de matrice au cours de la rétrotranscription et ainsi générer un ADN proviral recombinant (Ramirez et al., 2008). Ces formes hybrides sont ensuite classées selon le nombre de patients chez lesquels on les retrouve. Si la recombinaison est présente chez un seul patient ou des patients liés épidémiologiquement, alors c'est une URF (Unique Recombinant Form) ; si la recombinaison est présente chez au moins trois patients sans lien épidémiologique, alors c'est une CRF (Circulating Recombinant Form) (Taylor and Hammer, 2008). Les souches recombinées seraient responsables de 20% des infections à travers le monde (Hemelaar et al., 2011). La propriété de recombinaison du VIH est donc efficace pour produire de nouvelles souches virulentes.

Enfin, le cycle de réPLICATION du VIH est extrêmement rapide, c'est pourquoi la réponse B est systématiquement en retard sur la réPLICATION et diversification virale et permet l'échappement au contrôle du système immunitaire inadapté à l'instant T pour reconnaître Env. Ces mutations, seules ou combinées, sont la principale cause des échecs thérapeutiques (Smyth and Negroni, 2016).

1.1.3. Différents groupes

Les passages répétés de la barrière inter-espèce entre les Primates Non-Humains et Homme a divisé les souches de VIH en quatre groupes phylogénétiques : le groupe M (major), le groupe O (outlier), le groupe N (non-M, non-O) et le dernier groupe récemment identifié, le groupe P.

Il existe une grande disparité dans la prévalence et dans la répartition géographique des groupes ou sous-types de VIH à travers le monde. Les souches de VIH **des groupes N et P** sont endémiques au Cameroun et rares, elles ont été détectées chez moins de 20 individus (Delaugerre et al., 2011; Plantier et al., 2009). Les souches de VIH du **groupe O** sont également endémiques au Cameroun et certains cas ont été reportés aux Etats-Unis et en Europe bien que leurs prévalences restent faibles (Mourez et al., 2013; Vessière et al., 2010).

Les souches de VIH du **groupe M** sont responsables en majorité de la pandémie. Elles sont originaires de la République Démocratique du Congo et sont caractérisées par une grande diversité génétique. Au sein du groupe M, neuf sous-types de souches répartis à travers le monde ont été identifiés : A, B, C, D, F, G, H, J, K (Hemelaar et al., 2019).

Les stratégies de développement de vaccin doivent donc en priorité être tournées vers l'induction d'une protection contre les souches majoritairement retrouvées pour endiguer la pandémie. A noter que le sous type B prédomine dans les pays occidentaux. De plus, le sous-type C est responsable de la moitié des infections à travers le monde et se retrouve principalement dans les pays avec une forte prévalence du VIH tels que l'Inde et dans le Sud de l'Afrique (Hemelaar et al., 2019; Magiorkinis et al., 2016)

A ce jour, des formes recombinantes entre des souches des groupes M, O ou N ont été caractérisées, complexifiant encore le développement d'un vaccin efficace contre une majorité de souches infectieuses (Hemelaar et al., 2019). La variabilité du VIH est donc un enjeu majeur pour la conception d'un vaccin préventif car le système immunitaire doit reconnaître une grande diversité de cibles.

1.2. Transmission et cibles

1.2.1. Voies de transmission

Trois voies de transmission du VIH ont été identifiées. La transmission du virus par **voie sexuelle** au niveau des muqueuses génitales et rectales est responsable de 80% des cas d'infection. Toute personne peut être infectée par le VIH en absence de protection (préservatif) mais les HSH représentent environ 1/3 des personnes infectées en France et leur nombre ne diminue pas. Le sperme et les sécrétions vaginales contiennent des particules virales libres ainsi que des cellules infectées qui participent à la transmission du VIH entre les partenaires. Un partenaire avec une charge virale élevée, surtout en phase de primo-infection (pendant les premiers mois après l'infection), augmente le risque de transmission (Pilcher et al., 2004). D'autres facteurs tels les menstruations, les infections sexuellement transmissibles qui provoquent des microlésions, et les saignements pendant le rapport favorisent la transmission du VIH. A l'inverse, d'autres facteurs vont diminuer le risque de transmission comme par exemple la circoncision. La prise rapide de traitements préventifs (post exposure prophylaxis : PEP) suite à un rapport sexuel avec une personne séropositive a également fait ses preuves pour limiter les risques d'infections (Kumi Smith et

al., 2018). Le maintien d'une charge virale à des niveaux indétectables à l'aide de traitements antirétroviraux limite aussi grandement le risque de transmission (Rodger et al., 2016).

Le sang, notamment par les aiguilles chez les usagers de drogue par injection mais également par les objets tranchants infectés ou encore par la transfusion de sang non traité, est la deuxième voie de transmission.

La dernière voie de transmission est celle entre la **mère et l'enfant**. Le taux de transmission en absence de traitement est de 20% en France. Ce taux peut être diminué à 1 à 2% par la prise de traitement antirétroviral par la mère (Volmink and Marais, 2008). Cette transmission peut avoir lieu pendant la grossesse ou dans les mois suivant l'accouchement. En effet, l'infection de l'enfant peut se faire au cours du troisième trimestre mais le plus souvent c'est pendant l'accouchement que la transmission a lieu. Post accouchement l'allaitement du nourrisson peut mener à une infection, par le lait maternel.

1.2.2. Cibles cellulaires

Une des raisons qui explique la gravité de l'infection VIH est la cible de ce dernier. En effet, le VIH infecte des cellules qui expriment le récepteur et qui sont en grande majorité des cellules de la réponse immunitaire, et diminue leur nombre (Klatzmann et al., 1984; Nishimura et al., 2005). Cette diminution, de lymphocytes T (LT) notamment, va affaiblir le système immunitaire de l'hôte et induire l'apparition du stade SIDA.

L'entrée du VIH-1 dans une cellule cible est déterminée par l'expression du récepteur CD4 ainsi que par l'expression d'un corécepteur CCR5 ou CXCR4 sur cette cellule. Le corécepteur engagé par le VIH pour pénétrer dans la cellule défini le tropisme de la souche virale.

Les **LT CD4+** sont la principale cible du VIH (Klatzmann and Gluckman, 1986). Toutes les souches de VIH sont capables d'infecter le LT CD4+. Au cours de leur différenciation, les LT expriment un niveau variable de CCR5 qui sert de corécepteur lors de l'infection des lymphocytes activés/mémoire dans les premiers mois/années de l'infection (Brelot and Chakrabarti, 2018; Jansson et al., 1996). Les LT activés expriment fortement CD4 et CCR5 et ont un métabolisme très actif qui permet aux virus lymphocytotropes d'être hautement réplicatifs. L'infection de ces LT CD4+ CCR5+ induit leur déplétion et leur nombre devient alors trop limitant pour soutenir la réPLICATION virale. Chez certains patients, le virus peut alors muter et changer de tropisme pour infecter des cellules alternatives exprimant CXCR4

dans les phases tardives de l'infection et ainsi poursuivre la réPLICATION virale (Council and Joseph, 2018).

Tous les LT CD4+ expriment à leur surface CXCR4 qui peut également être utilisé comme corécepteur (Arrildt et al., 2012; Berger, 1998; Berger et al., 1998).

Certaines souches de virus HIV sont également capables d'infecter d'autres types de cellules immunitaires exprimant la molécule CD4 autre que les LT, comme les **monocytes**, les **macrophages** ou encore les **cellules dendritiques** (DC) (Lin et al., 2000). Ces cellules expriment cependant moins CD4 que les LT. Elles expriment le corécepteur CCR5 et sont donc la cible de virus à tropisme R5. Les souches de VIH à tropisme R5 se répliquent mieux dans ces cellules mais la réPLICATION du VIH dans les monocytes contribue peu à la charge virale. Cependant les monocytes sont capables de pénétrer dans les tissus et les monocytes infectés peuvent donc participer à la dissémination du VIH (Lin et al., 2000). Dans les monocytes, les virus sont peu réPLICATIFS et peu cytopathogènes (Richards et al., 2010).

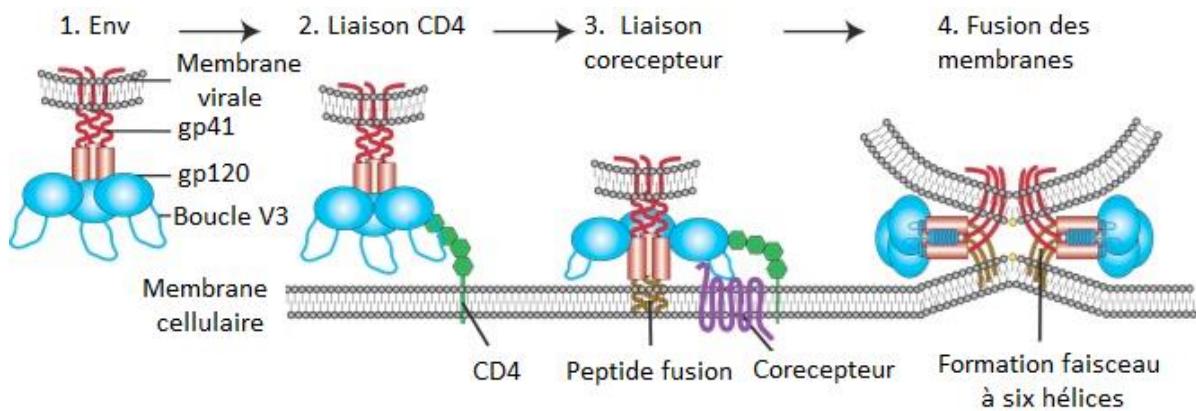
1.3. Etapes de l'infection cellulaire par Env

La protéine Env est l'unique protéine virale exposée à la surface du VIH et le site d'interaction avec la cellule hôte. C'est un homotrimère de glycoprotéine gp160. Cette gp160 est clivée par la furine, une protéase cellulaire, pour former les sous unités **gp120** et **gp41** (Hallenger et al., 1992). La gp120 est exposée à la surface du virus tandis que la gp41 est, elle, transmembranaire et liée de façon non covalente à la gp120 (Kowalski et al., 1987).

1.3.1. Infection

La gp120 se lie au récepteur CD4 exprimé par les cellules immunitaires (LT CD4+, monocytes/macrophages, et DC) par leur domaine de liaison au CD4 (Klatzmann and Gluckman, 1986; Klatzmann et al., 1984; Kwong et al., 1998; Lin et al., 2000; McDougal et al., 1986; Wu et al., 1996). Cette liaison induit un changement de conformation du trimère irréversible (Chen, 2019; Sattentau et al., 1993) et expose des sites jusqu'alors cachés tels que la boucle variable V3, essentiels à la fixation du corécepteur (Figure 3) (Berger et al., 1998; Freed et al., 1990). Le corécepteur reconnu, CCR5 ou CXCR4, dépend de la conformation de V3 de la gp120 qui peut fortement varier. Cette seconde interaction induit un second changement de conformation de la glycoprotéine permettant au peptide de fusion de s'insérer dans la membrane de la cellule hôte et entraîne la fusion de la membrane

du virus, médiée par la gp41, avec celle de cellule cible (Figure 2) (Zolla-Pazner et al., 2004). Un pore de fusion s'ouvre alors dans la membrane de la cellule, par lequel la capsid virale pénètre dans le cytoplasme cellulaire (Arhel et al., 2006; Wilen et al., 2012).



1. Structure de la protéine d'enveloppe Env. 2. Le VIH se lie à son récepteur le CD4 et induit le changement de conformation de la gp120 pour exposer son site de liaison au corécepteur. 3. La liaison de la gp41 avec le corécepteur induit d'autres changements de conformation qui permettent au peptide de fusion de s'insérer dans la membrane de la cellule. 4. La gp41 se replie et forme un faisceau à six hélices qui permet la fusion complète des deux membranes et entraîne la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule. Schéma traduit à partir de (Wilen et al., 2012).

1.3.2. Cycle de réplication viral

Dans la cellule hôte, la transcriptase inverse se fixe sur l'ARN viral et commence les cycles de réplication. Deux brins d'ADNc sont synthétisés à partir des deux brins d'ARN matrice. La transcriptase inverse hydrolyse alors la matrice d'ARN (Herschhorn and Hizi, 2010). Une fois l'ADN proviral synthétisé, il est importé dans le noyau à travers des pores nucléaires. L'enzyme virale intégrase insère définitivement l'ADN proviral dans une zone active de transcription de l'ADN de la cellule hôte (Jordan et al., 2001). Les gènes viraux intégrés dans l'ADN de la cellule infectée sont transcrits selon l'état d'activation de la cellule (Lusic and Siliciano, 2017). Les nouveaux ARN viraux sont transportés dans le cytoplasme à l'aide de Rev pour être traduits en protéines virales par la machinerie de traduction de la cellule hôte. Les protéines virales s'assemblent à deux molécules d'ARN viral pour former de nouveaux virions. Les virions bourgeonnent, s'enveloppent de la membrane de la cellule hôte et la quittent (Freed, 2015).

1.3.3. Dissémination et constitution du réservoir

Les monocytes, les macrophages et les DC recrutés au site d'infection dans les muqueuses sont les premières cellules infectées. Elles propagent ensuite l'infection rapidement à travers l'organisme. Elles migrent vers les ganglions lymphatiques, l'infection s'étend aux LT CD4+. Au début de l'infection, le virus est essentiellement produit par les LT CD4+ infectés activés. La réPLICATION DES CELLULES INFECTÉES participe à la dissémination du VIH par voie systémique dans l'organisme de l'hôte. Les macrophages infectés peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique ce qui permet au VIH d'atteindre les cellules microgliales. Les LT CD4+ infectés peuvent également participer à la dissémination systémique du VIH et transmettre le virus aux macrophages résidants dans les tissus. L'infection des LT CD4+ par le VIH peut également induire la formation de cellules géantes multinucléées, dans lesquelles des cellules infectées et non infectées fusionnent, entraînant la propagation de l'infection. En effet, les LT infectés sont capables de transférer le matériel viral du VIH dans les macrophages à la suite de contacts intercellulaires étroits induisant la fusion des LT infectés avec les macrophages. Cette fusion aboutit à la formation de cellules hybrides exprimant à la fois des marqueurs cellulaires de LT et de macrophages. Une deuxième fusion de ces cellules hybrides lymphocyte T/macrophage avec des macrophages environnants forme des cellules géantes multinucléées capables de produire des quantités importantes de particules virales infectieuses (Xie et al., 2019).

La dissémination du VIH permet l'établissement, dès les premiers mois de l'infection, du réservoir latent, composé des différentes cellules infectées (myéloïdes, lymphoïdes et multinucléées) qui ne produisent plus de virus. Les LT CD4+ du réservoir latent qu'ils soient naïfs ou mémoires, sont en état de quiescence et restent capables de produire du virus infectieux après activation des cellules. Ce réservoir est très peu voir inaccessible aux traitements antirétroviraux actuels et il est impliqué dans le maintien du virus dans l'organisme à long terme dans différents tissus tels que les organes lymphoïdes, les poumons, les tractus gastro-intestinal et génital et le système nerveux central (Finzi et al., 1997; Pannus et al., 2020). Les LT CD4+ mémoires ont été décrits comme le principal réservoir de l'infection et le plus étudié (Murooka et al., 2012). Récemment, les macrophages des muqueuses urétrales ont été décrites comme un autre réservoir important du virus. Etant les premières cellules ciblées par le virus lors de l'infection par voie sexuelles, ce réservoir viral peut s'établir dès le début de l'infection (Ganor et al., 2019).

1.3.4. Epuisement des LT

L'infection VIH est caractérisée par une lymphopénie, caractérisée par la destruction accélérée des LT CD4+ et l'épuisement lent des LT CD4+ non infectés (De Boer, 2007).

Morts cellulaires liées à l'infection virale

D'un part, on observe une perte directe des LT CD4+ infectés. Si le LT CD4+ infectés est activé et donc permissif (<5%), le VIH induit la lyse de cette cellule infectée. Si le LT CD4+ infectés (uniquement suite à une propagation virale cellule-cellule et non par infection d'un virion) est au repos et donc non-permissif (>95%), l'infection n'entraîne pas de production virale (infection abortive) mais l'accumulation de transcrits incomplets d'ADN virale dans le cytosol et la cellule meurt par pyroptose (Doitsh et al., 2014). D'autre part, Les LT CD8+ cytotoxiques et les anticorps participent à la destruction des LT CD4+ infectés et présentant par conséquent à leur surface des antigènes du VIH.

Homéostasie

La réponse homéostatique doit permettre de compenser la diminution d'une population cellulaire en rétablissant un équilibre numérique. Dans le cas du VIH, la perte massive de LT CD4+ due à l'infection entraîne la production massive de LT par le thymus après la phase primaire. Leur renouvellement et donc le nombre de LT CD4+ en division est alors deux à trois fois plus important chez les personnes infectées. Ces LT CD4+ originaires du thymus sont à leur tour infectés et détruits ce qui épuise leur production et rompt cet équilibre. Il a été montré que le nombre de LT CD4+ des personnes infectées par le VIH diminue tandis que leur taux de prolifération et l'apoptose augmente (Hazenberg et al., 2000). De plus, les LT CD4+ sont essentiels à l'architecture des organes lymphoïdes nécessaires à leur production efficace. L'épuisement des LT CD4+ affecte donc directement le système de leur propre régénération.

Activation chronique du système immunitaire

L'exposition directe des cellules épithéliales des muqueuses intestinales (et génitales) au VIH entraîne une rupture de la barrière muqueuse et ces dommages augmentent la perméabilité gastro-intestinale. Cette baisse de la résistance transépithéliale permet ainsi la translocations des bactéries et des virus (Tincati et al., 2016). Cette translocation induit une activation systémique du système immunitaire (Brenchley et al., 2006; Nazli et al., 2010)

De plus, la réPLICATION virale non contrôlée et la production de variants viraux induisent une production antigénique massive et permanente. Cette production antigénique induit une division cellulaire accrue dans les LT mémoires et augmente leur capacité d'auto-renouvellement. Pour éviter l'augmentation trop importante du nombre cellulaire, des mécanismes de frein sont induit simultanément telle que la mort cellulaire (Février et al., 2011). L'augmentation de la mort cellulaire au cours de l'infection VIH raccourcit la durée de vie des LT CD4+ activés et augmente le relargage de débris cellulaires ce qui entretient l'inflammation.

Cette activation chronique du système immunitaire est caractérisée par un renouvellement élevé, une activation et une prolifération non spécifiques des LT ; une activation polyclonale des lymphocytes B (LB) qui mène à leur épuisement et donc l'affaiblissement de la réponse humorale et la perte des LB mémoires (Moir and Fauci, 2009); des cytokines pro-inflammatoires circulantes et des chimiokines élevées telles que TNF α , IL-1 β ou IL-6 (Appay and Sauce, 2008).

1.4. Mécanismes d'échappement au contrôle de l'infection

En plus des propriétés génétiques vues précédemment (taux de mutation élevé, recombinaison) impliqués dans la diversité des variants de VIH observées chez les personnes infectées, plusieurs phénomènes peuvent expliquer la grande capacité du VIH à s'échapper au contrôle du système immunitaire, créant des obstacles majeurs pour la conception de vaccins.

1.4.1. Propriétés structurales

Rareté des protéines de surface

Seulement une dizaine de protéines Env sont présentes à la surface du VIH, laissant donc peu de cibles pour système immunitaire (Zhu et al., 2006).

Masquage conformationnel

Lors de l'infection d'une cellule par le VIH, le temps durant lequel la protéine apparaît sous forme dépliée est très court. Le repliement de la protéine Env le reste du temps permet au VIH de cacher un certain nombre de sites qui pourraient être des cibles pour les anticorps neutralisants (AcN) (Kwong et al., 2002).

Glycosylation

Le VIH capable sur Env qui le protègent de la reconnaissance par les AcN (Wei et al., 2003). Ces sucres, des glycanes, sont issus de la machinerie cellulaire de l'hôte et donc faiblement immunogènes. Les glycane, permettent un repliement fonctionnel de la protéine Env pour l'adhésion aux récepteurs membranaires, permettent donc au virion d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire (Shen et al., 2014).

1.4.2. Pression sélective

Système immunitaire

Le séquençage de génomes du VIH de patients infectés par le VIH révèle que de multiples mutations sont acquises au cours des premiers mois de l'infection. En effet, principalement les réponses cellulaires faisant intervenir des LT CD8+ ciblant le VIH, mais également les anticorps et les LT CD4+ exercent une pression de sélection sur le virus (Allen et al., 2005; Chung et al., 2011a).

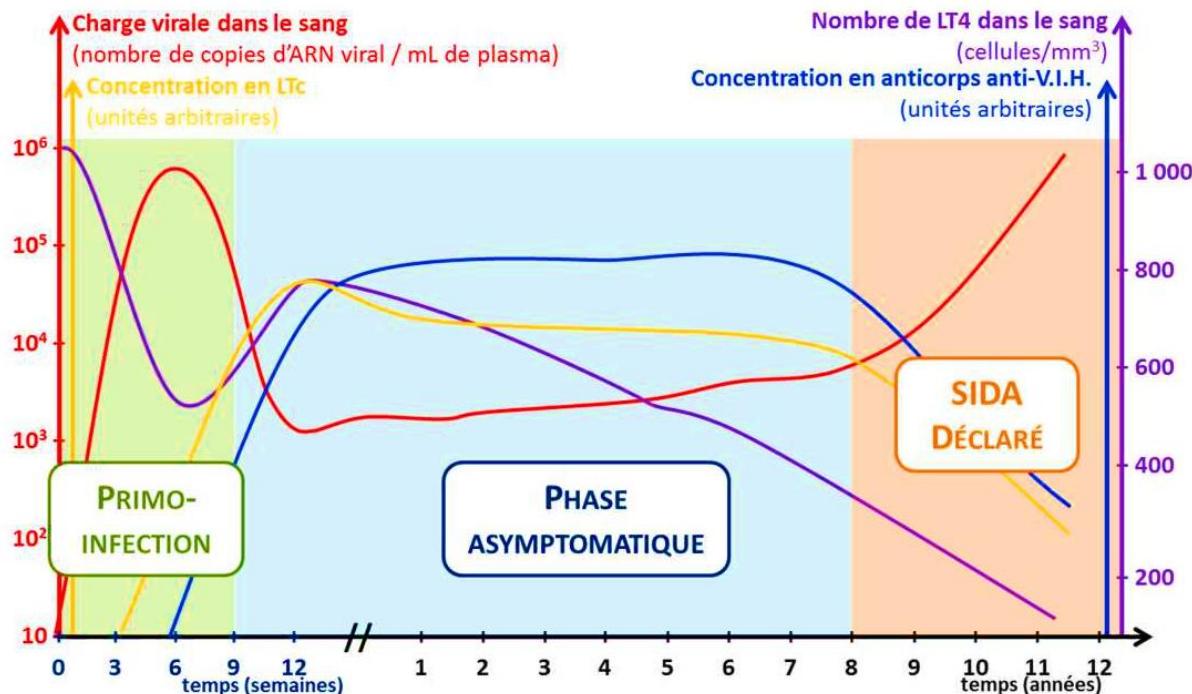
Le système immunitaire est capable de répondre à l'infection virale dans une certaine mesure en éliminant certains variants de la souche infectieuse initiale au bout de plusieurs semaines voire plusieurs mois. Pour les autres variants dont les sites de reconnaissances du virus ont mutés par exemple et qu'ils ne sont plus reconnus par le système immunitaire, celui-ci n'exerce pas de pression limitant leur réPLICATION(Wei et al., 2003). Au contraire, ces autres variants non reconnus par le système immunitaire poursuivent l'infection, deviennent majoritaires et mutent encore pour toujours augmenter la diversité des souches rencontrées au sein de l'individu (Horwitz et al., 2017). Ces variants d'échappement peuvent également être transmis à d'autre individus et ainsi conduire à l'augmentation de la diversité des souches avec les capacités de recombinaison du VIH.

Traitements

De la même manière, les traitements ARV participent à la pression sélective positive de certaines souches/variants. En effets, les ARV peuvent ne pas affecter tous les variants/souches de VIH et laisser d'autres devenir majoritaire. Adapter le traitement est donc nécessaire pour contrôler au mieux l'infection. De plus, la prise du traitement doit être rigoureuse afin d'éviter de laisser s'échapper un plus grand nombre de variants/souches.

1.5. Evolution de l'infection : phases et prédition

En l'absence de traitement antirétroviral, l'infection par le VIH comprend trois phases. Pendant la première phase aigüe, la primo-infection, le virus se réplique et se dissémine dans les tissus lymphoïdes. Puis, s'en suit une phase d'infection chronique sans symptômes cliniques qui précède le stade clinique SIDA, caractérisé par une immunodépression sévère qui favorise l'apparition d'infections opportunistes conduisant au décès (Figure 4).



L'infection chronique VIH se compose de trois phases identifiables d'après les variations de la charge virale et des réponses immunitaires (source : svt-oehmichen.over-blog.fr).

1.5.1. Primo-infection

La primo-infection débute 10-12 jours post-infection après une phase de latence nommée éclipse (Figure 5). Durant cette phase, la réPLICATION virale est très intense. Un pic très élevé de virémie est alors observé et est accompagné de symptômes, trop souvent discrets, dans un cas sur deux (syndrome pseudo grippaux ou mononucléosiques). Le risque de transmission est alors très élevé, plus encore si la personne infectée n'est pas symptomatique et ne se fait donc pas dépister car elle n'adoptera pas de comportement adapté. Les contaminations en primo-infection peuvent être sous-estimées à cause de

dépistages non réalisés mais elles représenteraient près d'un quart des cas de transmission (Pilcher et al., 2004).

L'infection de cellules quiescentes et la réPLICATION intense lors de la primo-infection engendre la constitution du réservoir viral. Les premiers LT CD8+ cytotoxiques apparaissent et détruisent les LT CD4+ infectés menant à la diminution brutale de leur taux dans le sang. Il faut attendre trois semaines pour voir apparaître les premiers anticorps anti-VIH dans le sang (séroconversion) dont le taux augmente progressivement et se maintient dans le temps.

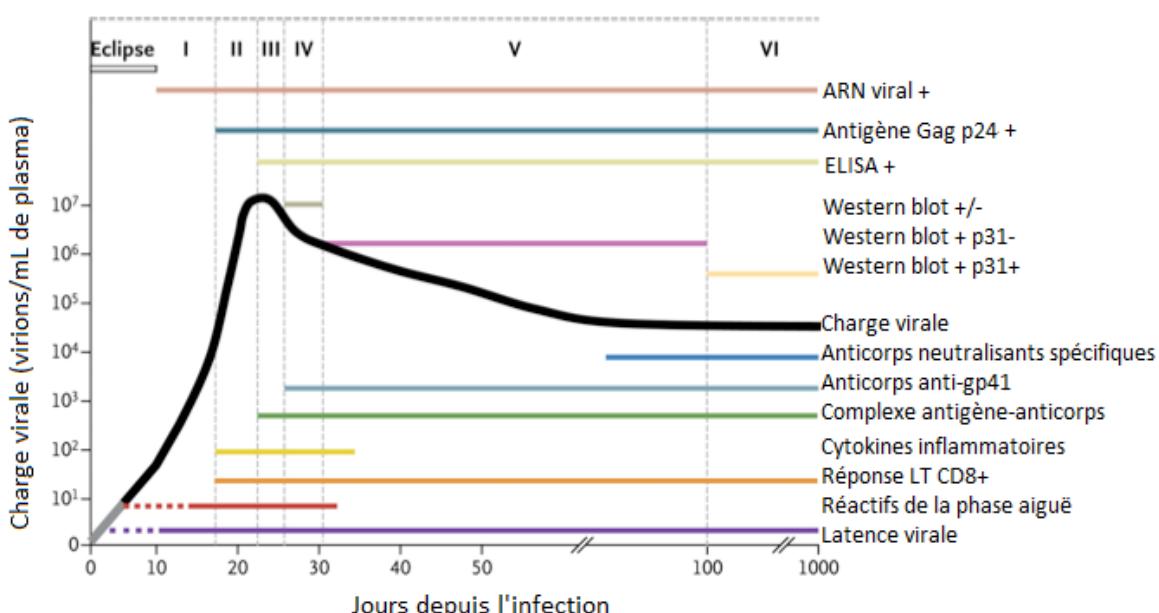


Figure 5 : Phases de l'infection VIH d'après la classification de Fiebig

L'éclipse et les six phases sont définies par (Fiebig et al., 2003) d'après la détection des marqueurs biologiques tels que l'ARN, les antigènes ou les anticorps présentés à droite du schéma.

Les réponses immunitaires amorcées durant la primo-infection diminuent la charge virale au bout de quatre semaines et conduisent à une période de latence clinique. Cette phase asymptomatique dure quelques années voire 10 ans. Autre conséquence, le taux de CD4+ dans le sang remonte au début de cette deuxième phase, sans atteindre son niveau initial (environ 1000/mm³) (Zeller et al., 1996).

Cette phase de latence clinique ne signifie pas qu'il s'agit d'infection virale latente car le virus se réplique à des niveaux élevés (Siliciano and Greene, 2011). Après quelques mois et pendant plusieurs années, le taux de CD4+ sanguin diminue lentement à cause de

l'épuisement du système immunitaire entre autres. Un équilibre fragile s'installe entre l'infection virale et le contrôle par la réponse immunitaire. Au cours de l'infection devenue chronique, peu à peu, la disparition des LT CD4+ entraîne une déficience du système immunitaire qui devient inapte à contenir l'infection.

Les premiers AcN dirigés d'abord contre Env n'apparaissent qu'au bout d'une dizaine de semaines et en faible quantité, ce qui laisse le temps au virus de se diversifier et au système immunitaire de sélectionner des virus les plus résistant à la neutralisation.

La réponse immunitaire contrôle partiellement le virus pendant plusieurs années mais cette réponse est incapable d'éradiquer le virus de l'organisme des personnes infectées par le VIH, et notamment à cause du réservoir.

1.5.2. SIDA

Pour 99% des personnes infectées, au bout de 10 ans sans traitement, l'équilibre immuno-virologique est rompu. Le taux de LT CD4+ dans le sang s'effondre et passe sous le seuil de 200/mm³ et la charge virale réaugmente pour dépasser les 10.000 particules d'ARN virales/mL de sang. La conséquence de cette immunodépression sévère est la contraction d'infections opportunistes ou le développement de certains cancers lors de cette phase symptomatique. L'espérance de vie des personnes atteintes de SIDA est alors de quelques mois sans traitement. Malgré les progrès sur les traitements qui augmentent sensiblement l'espérance de vie, l'infection VIH reste incurable et mortelle.

1.5.3. Prédiction de l'évolution de l'infection

Pour définir l'évolution de l'infection, plusieurs marqueurs cliniques sont utilisés tels que la présence de signes neurologiques chez le patient. La charge virale ainsi que le taux de LT CD4+ sont des marqueurs immunologiques qui servent à prédire l'évolution de l'infection vers le stade de SIDA.

L'équilibre immuno-virologique atteint dans les 6 premiers mois de l'infection conditionne la progression clinique et immunologique. Plus les quantités d'ARN et d'ADN VIH sont élevées et le taux de LT CD4+ est bas lors de la primo-infection, plus l'infection évolue rapidement vers le SIDA. La quantification des LT CD4+ en nombre absolu et leur pourcentage sont fortement corrélées à la progression de la maladie. Le nombre de LT CD4+ circulant chez les sujets VIH+ est l'outil le plus utilisé pour prédire l'apparition du SIDA et le meilleur marqueur de l'évolution de la maladie. La charge virale, ou plus précisément la quantité d'ARN VIH

plasmatique mesurée pendant la primo-infection, est prédictive du niveau de réPLICATION virale au plateau atteint sans ou après arrêt du traitement, quel que soit sa durée ou le moment auquel on l'a commencé (Shoko and Chikobvu, 2019).

1.6. Détection et traitement

1.6.1. Détection

Tous les dépistages en France sont prescrits par un médecin, volontaires et obligatoires en cas de dons de sang/organe/sperme. Pour rappel, comme les IST augmentent le risque de contamination par le VIH, un test VIH doit donc être prescrit après diagnostic d'une IST. Le diagnostic est posé (léggalement) après le résultat positif d'un prélèvement sur lequel est réalisé un test biologique combiné d'ELISA pour détecter la présence d'anticorps anti-VIH (séropositivité) et de l'antigène p24 (seuil de 2UI/mL soit 50pg/mL). Un résultat positif doit être confirmé par Westerblot/Immunoblot composé des principaux antigènes viraux pour différencier les infections VIH-1 et VIH-2. Du fait de la gravité d'un résultat VIH-1 positif, un second test sera réalisé sur un deuxième prélèvement.

Le dépistage de primo-infection VIH reste difficile car seul un cas sur deux va développer des symptômes souvent discrets tels que la fièvre, adénopathie avec angine, éruption, méningite, voire encéphalite dans la moitié des cas. De plus les symptômes du VIH sont non-spécifiques, on les retrouve dans d'autres infections comme par exemple un simple syndrome grippal. Enfin, les tests ELISA rapides qui détectent uniquement les anticorps anti-VIH, s'ils sont réalisés trop tôt après l'infection peuvent donner de faux résultats négatifs.

Pour le suivi d'une infection VIH sous traitement, il est recommandé de mesurer la charge virale 2 à 4 fois par an en France. La charge virale est déterminée à partir du plasma par RT-PCR pour quantifier l'ARN VIH. Le réservoir quant à lui est évalué dans les cellules mononucléées du sang d'après la quantité d'ADN VIH. Comme les anticorps anti-VIH d'une mère séropositive peuvent être transmis passivement à l'enfant, ces deux techniques sont aussi utilisées pour détecter (ou réfuter) une transmission mère-enfant après 2 tests. Dans les pays en développement, des tests ELISA simplifiés sont réalisés et les suivis individuels sont négligés pour des raisons économiques ce qui freine la prise en charge thérapeutique.

Chaque année, 5 millions de tests sont réalisés en France. Mais le nombre de diagnostics de primo-infection est faible par rapport aux estimations ce qui pose un réel problème car les personnes qui méconnaissent leur séropositivité sont à l'origine de 60% des nouvelles

contaminations. De plus, la moitié sont des diagnostiques tardifs avec des numérations de LT CD4+ <350/mm³. Le fait de diagnostiquer une infection tard retarde le début du traitement ce qui limite le temps au virus de se diversifier et d'échapper au contrôle du système immunitaire et diminue donc l'efficacité du traitement pour les individus.

Un test de résistance génotypique est réalisé quand la séropositivité est découverte (10% de virus résistant à au moins 1 ARV lors de la primo-infection) ou en cas d'échec du traitement. Ce test coûteux est sans intérêt dans un suivi de patient maintenant une charge virale plasmatique indétectable. Il consiste à séquencer des gènes impliqués dans le développement de mutations de résistance et séquencer la boucle V3 de la gp120 pour identifier le tropisme viral et ainsi adapter le traitement pour plus d'efficacité.

1.6.2. Traitement

Parmi tous les efforts réalisés pour arrêter la pandémie de VIH, le principal succès de la recherche médicale a été le développement des traitements antirétroviraux. Ces traitements se prennent quotidiennement sous forme d'un unique cachet. L'objectif de ces traitements de l'infection VIH est de rendre la charge virale plasmatique indétectable (< 50 copies /mL) et d'atteindre un nombre de CD4 > 500/mm³ en trois à six mois. Un autre bénéfice apporté par ces traitements est la réduction (mais pas la disparition) de la suractivation du système immunitaire et de l'inflammation associé (Autran et al., 1997; Guihot et al., 2010). Vingt traitements de l'infection VIH sont actuellement disponibles. Pour une meilleure efficacité et pour éviter le développement de résistance à un traitement (principale source d'échec devant l'irrégularité de prise), la stratégie adoptée depuis 1995 est de combiner trois ARV (Greene, 2007). Sans entrer dans les détails des différents traitements, ces inhibiteurs ont une des cinq cibles citées ci-dessous du cycle de l'infection ou de la réPLICATION virale (Engelman and Cherepanov, 2012) :

- Cibler la transcriptase inverse pour empêcher la transcription inverse de l'ARN virale en ADNc
- Cibler l'intégrase pour bloquer le transfert de l'ADN provirale dans le génome de la cellule hôte
- Cibler la protéase pour induire production de particules virales non infectieuses
- Cibler la gp41 en mimant la gp41 avec un peptide qui limite la fusion

- Cibler le corécepteur CCR5 avec un antagoniste du récepteur CCR5 pour bloquer l'infection par des souches avec un tropisme R5 identifié

Cependant, les ARV n'ont aucune action sur l'ADN proviral intégré dans les cellules infectées et donc n'affecte pas le réservoir viral (Finzi et al., 1997; Pannus et al., 2020). Plus le traitement est précoce (quelques jours voire semaines), plus on cantonne la dissémination du VIH dans l'organisme, plus on limite la diversité des quasi-espèces, plus on prévient la déplétion lymphocytaire et donc le déficit immunitaire.

En cas d'arrêt du traitement, celui-ci n'exerce plus de pression sur le virus et entraîne un rebond viral (Pannus et al., 2020). Le virus présent dans le réservoir latent peut alors se répliquer et infecter de nouvelles cellules, démultipliant le nombre de virus et diminuant à nouveau le nombre de LT CD4+ et accélérant la progression vers le stade SIDA (Palmisano et al., 2007). Sans traitement, l'espérance de vie des individus infectés par le VIH est réduite à une dizaine d'année.

1.7. Paramètres génétiques associés à la protection chez les patients VIH+

Pour rappel, la réponse immunitaire induite juste après la primo-infection est capable de partiellement contrôler l'infection, notamment par des réponses anticorps et cytotoxique, bien que ce contrôle ne perdure pas dans le temps à cause de l'affaiblissement du système immunitaire dû à l'infection. Cependant certains individus ont été identifiés comme capables de contrôler l'infection à plus long terme.

Chez l'Homme, 5% des personnes atteintes du VIH réussissent à contrôler l'infection et à repousser l'apparition de la phase du SIDA plus longtemps que les autres. Des études immunologiques et virologiques de ces individus particuliers sont utiles pour identifier des facteurs impliqués dans le contrôle du VIH tels que les anticorps neutralisants à large spectre ou des facteurs associés à la perte du statut de non-progresseur pour identifier des facteurs de pronostique précoce de l'évolution de l'infection (Madec et al., 2009).

Ces patients sont regroupés selon leurs paramètres immuno-virologiques tels que l'absence de symptômes, une charge virale ARN et/ou ADN très faible voire indétectable, un taux de LT CD4+ normal et/ou l'absence de prise de ARV pendant plusieurs années après infection. Différentes populations ont été définies avec des critères différents dans chaque nouvelle cohorte. Les données sont donc difficilement comparables entre chaque étude. Cependant, ces études ont permis de grandes avancées dans l'étude de la conformation de Env et dans

l'identification d'épitopes d'intérêt pour le développement de candidats vaccins induisant des AcN à large spectre. Les groupes de patients les plus étudiés sont les LTNP (« Long Term Non Progressor ») et les EC (« Elite Controler ») mais on compte également les progresseurs lents, les contrôleur du VIH, les neutraliseurs élites ou encore les contrôleurs virémiques (van Gils et al., 2016).

Un premier groupe de patients [LTNP](#) a donc été défini sur les critères suivants : une charge virale très faible toujours inférieure à 5 000 copies d'ARN-VIH/ml mais détectable et le maintien taux de LT CD4 supérieur à 500 cellules/mm³ pendant huit à dix ans après diagnostic. Ces patients sont capables de contrôler l'infection pendant une dizaine d'année après séroconversion sans prise de traitement avant de progresser vers le SIDA.

Il existe un deuxième groupe de patients capable de contrôler l'infection sans prise de traitement et en conservant un nombre élevé de LT CD4+ appelé [EC](#). La différence avec les LTNP réside dans le niveau de la charge virale qui est indétectable (inférieures à 50 copies/ml) pour les EC et surtout dans le fait qu'ils ne progressent pas vers la phase de SIDA.

L'étude de paramètres génétiques comme l'expression d'allèles des [HLA](#) de classe I (ou Complexe Majeur Histocompatibilité de classe I : CMH I) a mis en évidence des allèles associés à un contrôle de l'infection chez 67% des individus EC (HLA-B*57, HLA-B*27, HLA-B*13 et HLA-B*58:01). Cependant, la détection de ces mêmes HLA particuliers chez 37% des individus progresseurs indique que ces allèles sont insuffisants pour permettre le contrôle de l'infection. Un autre indice pouvant expliquer le statut non progresseur des EC est leur fréquence plus élevée de LT CD8+ polyfonctionnels et leur capacité à contrôler la réPLICATION virale dans les LTCD4+ infectés par rapport aux LT CD8+ des non contrôleurs (Walker, 2007).

D'autres caractéristiques génétiques telle que la délétion de 32 paires de bases sur l'allèle codant CCR5 sont associées à la résistance à l'infection du VIH. En effet CCR5 est un corécepteur exprimé à la surface des cellules cibles utilisé par le VIH pour les infecter telles que les macrophages, DC, LT CD4+ activés et mémoires. Cette délétion empêche CCR5 d'être transloqué à la membrane et donc au VIH de fusionner (Liu et al., 1996).

2. Développement d'un vaccin préventif contre le VIH

Dans cette seconde partie, je vais aborder le principe de la vaccination en me concentrant sur la protection contre le VIH. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte lors de la conception d'un vaccin candidat. Après avoir identifié un type de réponse immunitaire qui devrait être efficace pour protéger l'individus contre l'infection, l'objectif est d'induire cette réponse par la vaccination. Pour se faire, la première étape est l'identification d'antigène contre lequel sera dirigé la réponse immunitaire. L'autre défi majeur est de savoir comment assurer l'immunogénicité de cet antigène avec des systèmes de protéine « carrier », des adjuvants ou encore des système de d'administrations adaptés (De Gregorio and Rappuoli, 2014; Rappuoli et al., 2019).

Je décrirais plus particulièrement le candidat vaccin W614A-3S utilisé au cours de ma thèse pour l'étude des mécanismes d'induction d'une réponse neutralisante contre le VIH développé dans la troisième partie de ce manuscrit.

2.1. Généralités sur la vaccination

La reconnaissance des antigènes du pathogène par le système immunitaire avec un antigène du pathogène infectieux lors de la vaccination permet de préparer notre système immunitaire à répondre rapidement et efficacement lors d'une possible future rencontre avec ce pathogène. Il s'agit du principe d'immunisation qui protège contre l'infection, et par conséquent contre l'apparition des symptômes de la maladie, et qui limite la transmission. La vaccination protège l'individu vacciné, mais également son entourage. De plus, la vaccination permet de protéger les personnes ne pouvant pas l'être : les femmes enceintes, les personnes souffrant d'une affection contre-indiquant la vaccination, les personnes âgées ou encore les nouveau-nés.

L'histoire de la vaccination commence dans les années 1770-90, lors de l'épidémie de variole, suite à l'observation d'une protection contre la variole chez les trayeuses de vaches qui avaient auparavant contracté la vaccine (homologue de la variole chez l'homme). Pour vérifier son hypothèse, Jenner inocule à un enfant le pus contenus dans les abcès de la main d'une trayeuse qui avait contracté la vaccine, puis lui inocule la variole sans pour autant le rendre gravement malade. Ces résultats conduisent à remplacer la variolisation où on inoculait à des sujets sains du pus provenant de lésions d'un malade de la variole elle-même

par cette nouvelle méthode moins dangereuse. Le terme « vaccination » découlera de ce principe d'immunisation par un germe atténué.

100 ans après, Louis Pasteur suppose que la vaccine serait une forme atténuée de la variole et fait l'hypothèse que l'injection d'une forme atténuée d'un microbe pourrait protéger de la maladie qu'il provoque. Début des années 1880, il confirme chez des animaux d'élevage, que l'injection d'une variété atténuée protège contre des maladies telles le choléra des poules (inoculation de culture bactériennes vieillissantes) et le charbon des ovins et bovins après inoculation d'une variété virulente de ces maladies. A partir de ces conclusions, il élabore un vaccin contre une maladie à la fois animale et humaine : la rage. A partir de virus de lapin (durée d'incubation courte) atténué (moelles épinières séchées à l'air) il immunise des chiens en quinze jours. Après quoi, en 1885, il vaccine un enfant mordu par un chien enragé ce qui l'empêche de développer la rage. Le traitement de trois cent cinquante autres personnes inaugure le début de la vaccination.

Depuis, des progrès considérables ont été faits en immunologie et dans d'autres domaines, tels que la biochimie ou la génétique qui ont permis de développer des vaccins contre différents types d'infections et d'ainsi protéger la population du tétonos, de la coqueluche, ou encore des méningites.

C'est ainsi que des infections graves telles que le tétonos, la poliomyélite ou encore la rage sont maintenant parfaitement contrôlées dans les pays développés grâce à la vaccination systématique. L'efficacité de la vaccination a également été illustrée grâce à l'éradication totale de la variole à travers le monde, pourtant due à un virus très contagieux. Il reste cependant certaines maladies qui ont disparu (ou sont devenues très rares) en France, comme la diphtérie, très contagieuse, disparue en 1945 grâce à la vaccination, qui sont toujours présentent dans d'autres régions du monde moins développées, où la vaccination est plus difficile. Nous devons donc nous rappeler de l'importance de la vaccination pour éviter la réémergence de ces maladies.

De par leur nature ou leur composition, certains vaccins peuvent induire des effets secondaires plus ou moins forts. Dans certains cas, les vaccins peuvent générer des rougeurs, de la fièvre, des céphalées ainsi que des douleurs au site d'injection. Ces effets « indésirables » résultent de l'activation du système immunitaire et sont donc amplifiés par l'ajout de certains d'adjvant par exemple. Ils doivent cependant être limités au maximum

pour envisager la commercialisation des vaccins candidats, pour garantir le bien-être des personnes vaccinées très important pour l'acceptabilité des vaccins.

2.2. Orientation d'une réponse immunitaire adaptative

L'objectif principale de la vaccination est de préparer le système immunitaire à répondre rapidement et efficacement lors d'une possible future rencontre avec un pathogène en induisant une mémoire immunitaire durable et efficace. Ces vaccins sont dits prophylactiques et sont administrés chez des personnes saines pour prévenir d'un risque d'infection. Les vaccins peuvent également être thérapeutiques et être administré chez des patients pour soigner leur infection. L'objectif défini est important à prendre en compte pour définir la stratégie de vaccination. Par opposition à l'immunisation passive par transfert d'anticorps, la vaccination par immunisation active est l'introduction d'un matériel antigénique dans l'organisme pour induire une réponse immunitaire adaptative, et notamment une immunité mémoire, contre un agent infectieux.

Les stratégies de vaccination active reposent sur la capacité de l'individu et son système immunitaire à répondre à un stimuli pour induire une réponse protectrice à long terme contre une infection. L'infection VIH induit plusieurs types de réponses. Les deux principales sont la réponse cellulaire avec les LT CD8+ cytotoxiques, qui détruisent les cellules CD4+ infectées par le virus, et la réponse humorale, avec la production d'anticorps spécifiques du VIH. Ces deux réponses ne sont pas suffisamment efficaces pour contrôler à temps et éradiquer l'infection mais peuvent être utilisées dans des stratégies de vaccination préventives. Je vais à présent vous détailler les deux types de réponses immunitaires adaptatives qui peuvent être mis en jeu dans la protection contre les infections.

2.2.1. Réponse cellulaire

Les LT CD8+ cytotoxiques sont des effecteurs de la réponse immunitaire acquise. Ils détruisent les cellules infectées ou modifiées. Les cellules infectées par le VIH synthétisent des protéines virales qui se retrouve dans le cytosol. Ces protéines sont dégradées en antigènes de 8 à 10 AA par le protéasome. Ces peptides sont transportés par le complexe TAP et traversent la membrane lipidique du réticulum endoplasmique puis sont chargés sur le CMH I. Ils sont ensuite transportés jusqu'à la surface membranaire. Un même peptide peut se retrouver plusieurs milliers de fois sur une même cellule. Le TCR des LT reconnaît le peptide présenté sur le CMH I présent sur toute cellule infectée. D'un côté, une réponse T efficace est dite polyfonctionnelle et se caractérise par une production d'IL-2, d'IFN γ , de

TNF α ainsi qu'une bonne capacité de prolifération. Les réponses T polyfonctionnelles sont retrouvées de façon plus fréquente chez les patients non progresseurs (Betts et al., 2006).

Les LT CD8+ cytotoxiques sont capables de tuer une cellule infectée par dégranulation de granules contenant des composés lytiques tels que la perforine. Les LT CD8+ cytotoxiques des patients EC ont aussi la capacité à contrôler la réPLICATION virale dans les LT CD4+ infectés, ce qui n'est pas le cas des patients avec une virémie détectable. Bien que le rôle protecteur des LT CD8+ cytotoxiques dans l'infection VIH soit discuté, certaines stratégies vaccinales contre le VIH ont pour objectif d'induire ce type de réponse. En effet, d'un côté, la déplétion des LT CD8+ cytotoxiques dans des modèles précliniques a entraîné une accélération de l'infection, avec aggravation rapide du déficit immunitaire provoquant la mort (Jin et al., 1999). D'un autre côté la déplétion de LT CD8+ n'entraînait pas une augmentation de la survie des cellules infectées (Klatt et al., 2010). Ces résultats montrent le rôle intéressant et potentiellement efficace des réponses LT CD8+ dans le contrôle de l'infection VIH, cependant les stratégies vaccinales visant à induire ce type de réponse ne seront pas décrites dans la suite de cet exposé.

2.2.2. Réponse humorale

Les anticorps sont des protéines effectrices, des Ig, synthétisées par les LB et les plasmocytes qui en dérivent. Les Ig peuvent rester liées à la membrane des LB ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire par les plasmocytes. Leur rôle est de maintenir l'intégrité du milieu extracellulaire des toxines, bactéries extracellulaires et virus. Chaque LB possède un épitope, ou déterminant antigénique unique capable de reconnaître un antigène unique. Il existe une grande diversité de spécificités au sein du réservoir de LB permettant de reconnaître une quasi infinité d'antigènes (Tonegawa, 1983).

Les anticorps, qu'ils soient sécrétés ou membranaires, peuvent avoir plusieurs fonctions telles que la neutralisation de toxines, le blocage de l'infection par les virus ou l'inhibition de l'adhésion de pathogènes aux cellules. Dans le cadre de la vaccination je vais me pencher plus particulièrement sur les rôles des IgG.

ADCC

Une des fonctions des anticorps pour protéger l'organisme des infections est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ADCC. Dans un premier temps, les anticorps recouvrent la cellule infectée ou les microorganismes pathogènes après reconnaissance de

leur antigène spécifique. Dans un deuxième temps, des cellules effectrices cytotoxiques telles que les NK, neutrophiles et les éosinophiles reconnaissent des portions de Fc des Ig par leur FcR. Ces cellules s'activent et sécrètent des granules cytotoxiques (perforine et granzyme), des cytokines comme le TNF, des protéases et des dérivés réactifs de l'oxygène pour tuer les cellules infectées.

Complément

Dans le processus de cytotoxicité dépendant du complément (CDC), de la même manière que pour l'ADCC, les anticorps commencent par reconnaître leur antigène spécifique sur un virus par exemple et s'y fixent. Par la suite, le complément reconnaît ce complexe antigène-anticorps et se lie à son tour. A ce stade, soit le complément induit la lyse du pathogène (voie classique), soit il induit l'opsonisation (voie alternative).

ADCP

Une autre fonction des anticorps est la phagocytose à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCP). Les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les DC reconnaissent la fraction Fc des anticorps fixés sur le pathogène comme un virion par exemple, phagocytent le pathogène et le détruisent.

Neutralisation

Les Ig sécrétées peuvent être neutralisantes lorsqu'elles sont dirigées spécifiquement contre un antigène au site de liaison du virus (Env dans le cas du VIH) et qu'ils sont suffisamment affins pour leur épitope. La liaison des AcN à la surface du virus empêche l'infection des cellules par celui-ci et déclenche l'ADCC (Bruel et al., 2016; Zolla-Pazner et al., 2004). La neutralisation participe donc au contrôle de l'infection et permet d'endiguer la transmission entre les cellules (Bruel et al., 2017). La neutralisation est le principal processus dans la défense contre un grand nombre de pathogènes.

2.2.3. Réponse Anticorps neutralisants contre le VIH

Dans cette étude bibliographique, j'ai choisi de me concentrer sur les stratégies de vaccination permettant l'induction d'anticorps neutralisants contre le VIH.

Les anticorps développés pendant les premiers mois (entre neuf semaines et un an) après l'infection VIH ont une faible capacité de neutralisation qui se limite dans la plupart des cas à la souche à l'origine de l'infection. Les AcN à large spectre sont des AcN capables de neutraliser différents variants et différentes souches du VIH. Ces AcN à large spectre

peuvent être retrouvés quelques années après infection chez certains patients dont certains qui contrôlent l'infection et sont dit EC (Simek et al., 2009). Une étude montre que la déplétion des LB par un traitement au Rituximab chez des patients infectés par le VIH entraîne une perte du contrôle viral et la chute du taux de LT CD4+ sanguins. La réponse humorale semble donc participer activement au contrôle de l'infection VIH (Huang et al., 2010).

De plus, une étude montre que différents AcN monoclonaux anti-Env peuvent efficacement bloquer la propagation du virus sans cellules *in vitro* et, à des concentrations plus élevées, peuvent également empêcher la transmission de cellule à cellule et ainsi prévenir la mort pyroptotique des cellules (Luo et al., 2021). Ces résultats suggèrent que le développement de vaccins induisant de fortes réponses AcN seraient efficace dans le contrôle de l'infection VIH.

C'est entre autres pourquoi actuellement l'un des principaux objectifs des vaccins anti-VIH est l'induction d'anticorps capables de neutraliser un large panel de souches. Cette réponse doit être maintenue dans le sang afin d'être efficace contre les nombreuses souches et les nombreux variants de VIH. Les différentes souches de VIH sont classées en 3 « tiers » en fonction de leur sensibilité à la neutralisation. Les souches de niveau 1 (tiers 1) sont les plus sensibles aux AcN et les niveau 3 (tiers 3) sont les plus difficiles à neutraliser. Un panel de référence de 12 souches a été identifié par Montefiori (deCamp et al., 2014a) comme représentatif de l'épidémie mondiale incluant ces différents tiers. Leur obtention reste difficile du fait de la diversité génétique du VIH comme vue précédemment et de la difficulté de trouver un antigène commun contre lequel seraient dirigés ces AcN à large spectre. De plus ces anticorps ont comme caractéristique moléculaire une hypermutation intensive, phénomène induit par la maturation des LB et pouvant être induit par l'exposition répétée aux antigènes viraux par immunisation dans le cadre d'une vaccination préventive (Montefiori and Mascola, 2009).

La stratégie a adopté pour induire des AcN à large spectre par la vaccination est encore discutée et non résolue. La compréhension des mécanismes conduisant à la production de ces AcN est une étape importante pour le développement des stratégies vaccinales contre le VIH. La variation antigénique au cours de l'infection par le VIH peut augmenter le nombre de cycles itératifs de maturation d'affinité dans les centres germinatifs (CG). Différents scénarios de maturation d'affinité menant à la production d'AcN à large spectre ont été

proposés (Victora and Mouquet, 2018). Dans un premier cas, il a été suggéré l'existence d'un LB naïf non muté précurseur d'AcN qui entre dans un **CG à longue durée de vie**. L'exposition successives à des variantes antigéniques du virus entraînerait la maturation d'affinité du clone au sein de la même réaction GC, jusqu'à atteindre un large spectre de reconnaissance antigénique. Dans un second cas, un LB naïf non muté précurseur d'AcN entre dans un CG, subit des cycles de maturation et en sort en tant que LB mémoire. Ce LB mémoire est rappelé dans un deuxième CG lors de l'exposition à un variant antigénique muté du virus. Les cycles successifs **d'entrée et de sortie de différents CG** entraînent l'acquisition d'un large spectre de reconnaissance antigénique.

Les deux modèles ne s'excluent pas mutuellement, cependant, seul le deuxième scénario peut actuellement être déclenché par la vaccination avec des sous-unités protéiques. En effet, les GC induites par l'immunisation sont généralement de courte durée, disparaissant après 3 ou 4 semaines. Pour reproduire la maturation d'affinité menant à la production d'AcN à large spectre avec la vaccination, il semble nécessaire de développer de comprendre les mécanismes d'action des adjuvants et comment formuler des antigènes visant à prolonger la durée de la GC.

2.3. Types de vaccins

Pour induire ces réponses adaptatives et développer un vaccin efficace contre un agent infectieux pathogène tel que le VIH, il existe différentes approches.

2.3.1. Vaccin tué ou inactivé

Ces vaccins sont constitués de l'agent pathogène entier. Un traitement physique (chaleur ou rayonnement) ou chimique tue ou inactive ces bactéries ou virus qui sont alors incapables de se multiplier donnant un vaccin très contrôlé. L'état de mort ou d'inactivation détruit une partie des pathogènes contenant des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP). Lors de l'injection de ce type de vaccins, les CPA reconnaissent moins de PAMP que lors d'une rencontre avec le pathogène entier par leur récepteurs de reconnaissance de formes (PRR), tels que les récepteurs Toll-like (TLR), ce qui diminue l'immunogénicité du vaccin (Lambe et al., 2012).

2.3.2. Vaccin vivant atténué

Les vaccins vivants atténués sont eux constitués d'un agent infectieux vivant qui a été modifié par mutation, pour induire la perte de sa virulence tout en conservant sa capacité à

se multiplier après injection. Ces vaccins présentent de nombreux PAMP qui stimulent plusieurs types de PRR. Ils sont donc très immunogènes et permettent d'induire une protection efficace chez la personne vaccinée (Ambrose et al., 2008; Zheng et al., 2012). Ces vaccins présentent cependant des problèmes d'innocuité de par leur nature infectieuse et ne sont pas prescrits chez les femmes enceintes, les jeunes enfants, les personnes immunodéprimées ou âgées.

2.3.3. Vaccin à vecteur viral

Contrairement aux vaccins inactivés ou atténués, les vaccins à vecteur viraux ne sont pas composés de l'agent infectieux d'intérêt dans son ensemble. En effet seule une partie immunologiquement intéressante du pathogène pour la vaccination est insérée dans le génome d'un autre agent infectieux non virulent, le vecteur. Le vecteur est généralement un virus inoffensif modifié pour être incapable de se reproduire (dit « non réplicatif ») après injection dans les cellules humaines. Le matériel génétique inséré sert à produire les protéines de l'agent pathogène cibles pour la réponse immunitaire. Les vecteurs sont très immunogènes et permettent ainsi d'induire une forte réponse immunitaire adaptative et de s'affranchir des risques liés au pathogène dont seul un fragment de matériel génétique est utilisé, ce qui rend impossible la génération de particules infectieuses complètes (Barouch and Picker, 2014). Cette stratégie est efficace pour induire une réponse immunitaire contre le pathogène d'intérêt bien que la première injection vaccinale induit majoritairement des réponses contre le vecteur lui-même. Il est également à noter qu'une précédente vaccination ou une infection naturelle avec un virus proche du virus vecteur, et notamment les adénovirus, induit une immunité préexistante pouvant diminuer l'immunogénicité de ces vaccins (Casimiro et al., 2003a). La diversité des vecteurs viraux permet d'outrepasser cet inconvénient.

Les vecteurs les plus utilisés sont les virus dérivés de la vaccine de la souche Ankara, les adénovirus (Ad) ou le cytomégavirus (CMV) (Hansen et al., 2013). Les adénovirus ont été très largement utilisés dans le cadre de la recherche d'un vaccin contre le VIH et notamment l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) puis l'Ad26 (Casimiro et al., 2003b).

Depuis les années 2000, de nombreux essais précliniques de challenge chez des primates non-humains, ont utilisé Ad5 pour exprimer la protéine Gag d'un SIV. Ces études ont mis en évidence des capacités limitées de protection contre le SIV. Par la suite, d'autres vecteurs ont été utilisés pour améliorer ces résultats tels que l'Ad26, utilisé dans des stratégies de

prime/boost combiné à un vaccin à vecteur viral MVA ou à un vaccin protéique gp140 (Barouch and Picker, 2014; Barouch et al., 2012, 2015). Les vecteurs viraux peuvent également contenir une mosaïque d'épitopes viraux. C'est notamment le cas du projet APPROACH, un vaccin à vecteur adénovirus.

Récemment, les vecteurs viraux ont également été utilisés pour exprimer directement des AcN à large spectre en s'affranchissant du mécanisme long et complexe de maturation de la lignée des cellules B pour l'obtention des AcN à large spectre. Les anticorps produits par les cellules grâce à cette technique de « Vectored antibody gene delivery » ont montré leur efficacité de protection dans des études précliniques et offrent ainsi une alternative au transfert passif de d'AcN à large spectre qui ont une faible durée de vie et nécessitent une administration régulière (Balazs et al., 2011, 2014; Deal and Balazs, 2015).

2.3.4. Vaccin sous-unitaire

Les vaccins sous-unitaires, ou sous-particulaires, à la différence des vaccins à vecteurs viraux, sont exclusivement composés du fragment spécifique de l'agent pathogène cible du système immunitaire, tel que sa paroi ou sa toxine. L'antigène est présent sous forme protéique ou saccharidique, et provient d'une fabrication *de novo* ou d'un traitement de l'agent infectieux. La taille de l'antigène étant très limité, les vaccins sous-unitaires ne stimulent pas de PAMP donc l'immunogénicité de ces vaccins, s'ils étaient formulés uniquement avec l'antigène, serait limitée. C'est pourquoi l'ajout d'un adjuvant ou un système de liposome est nécessaire (Perrie et al., 2008).

2.3.1. Vaccin à base d'acides nucléiques

Les vaccins à base d'acides nucléiques peuvent être soit à ADN, soit à ARNm. Ces deux molécules portent la séquence génétique qui code l'antigène spécifique de l'agent infectieux contre lequel on veut obtenir une réponse immunitaire protectrice. Ces molécules d'ADN ou d'ARNm passent la membrane des cellules présentes au site d'injection comme par exemple les macrophages ou les cellules musculaires en cas d'injection intra-musculaire (IM).

La différence entre les deux types de vaccins à base d'acides nucléiques est une étape supplémentaire pour les vaccins à ADN. Une fois à l'intérieur du cytoplasme des cellules, l'ARNm va directement être traduit en protéine tandis que l'ADN doit d'abord aller dans le noyau de la cellule pour être transcrit en ARNm avant de pouvoir être traduit en protéine dans le cytoplasme.

Les vaccins de type acides nucléiques sont incapables de s'intégrer au génome des cellules hôtes, il reste sous forme épisomal dans le cytoplasme ou dans le noyau. Les vaccins ADN ont l'avantage d'être plus stables et moins fragiles que l'ARN mais leur immunogénicité est souvent faible. Les vaccins ARN, quant à eux, présentent l'avantage de pouvoir directement être traduits en protéine dans le cytoplasme ce qui facilite la production d'antigène et les rend donc plus immunogènes.

Une fois la protéine antigénique de l'agent infectieux produite par la cellule elle peut persister pendant des jours voire des semaines, ce qui lui laisse le temps d'être reconnue par le système immunitaire et induit une réponse protectrice spécifique contre le pathogène (Martinon et al., 1993). La production *in vivo* de l'antigène permet de synthétiser des protéines correctement glycosylées et dans leur conformation native, reproduisant ainsi les épitopes natifs des protéines du pathogène, une forme difficile à obtenir par synthèse peptidique *in vitro*.

Tout comme les vaccins sous-unitaires, les molécules ADN ou ARN sont peu immunogènes et nécessitent soit un système de délivrance particulier, soit l'ajout d'un adjuvant, soit l'encapsulation dans des vecteurs lipidiques inertes qui peuvent être d'origine bactérienne qui présente des motifs CpG pour stimuler l'immunité (Casimiro et al., 2003a; Ulmer et al., 2006). De plus, la transfection des cellules avec ce type de molécules n'est pas un mécanisme actif au contraire des vecteurs viraux donc et requiert des quantités d'ADN relativement importantes.

Jusqu'à récemment, cette technique à base d'acides nucléiques était au stade d'essais cliniques pour certains vaccins à ADN ou ARN, contre le virus Zika, la grippe, Ebola ou encore des cancers (Ferraro et al., 2011; Pardi et al., 2018). Depuis la pandémie de COVID-19, plusieurs vaccins ARNm ont adapté cette technologie au Sars-CoV-2 et ont ainsi pu passer avec succès les différents stades des essais cliniques. L'adaptabilité de cette technologie a permis de gagner un temps considérable dans le développement des vaccins anti-Sars-CoV-2, temps précieux au vu de l'urgence de la situation. Ces vaccins, tels que BioNTech-Pfizer, Moderna ou CureVac (Anderson et al., 2020; Mulligan et al., 2020) ont obtenu une autorisation de mise sur le marché avec une efficacité allant jusqu'à 95%.

2.4. Différentes phases de validation d'un vaccin et corrélats de protection

Pour apprécier la sécurité et l'efficacité des candidats vaccins, pour le VIH comme pour toutes les infections, plusieurs étapes sont nécessaires.

2.4.1. Modèles précliniques d'étude du VIH

Les modèles animaux permettent d'étudier l'immunogénicité et les capacités de protection des vaccins candidats lors des phases précliniques avant d'être transposés en phase clinique chez l'Homme puis d'être mis sur le marché. La première étape pour évaluer l'efficacité d'un vaccin est donc de déterminer le modèle qui reflète au mieux les réponses humaines. Aucun modèle n'étant parfait il est important de connaître les avantages et les limites de chacun (Hatzioannou and Evans, 2012).

Pour qu'une espèce soit susceptible d'être utilisée dans des études précliniques du VIH, son système doit à l'évidence supporter l'infection de ses lymphocytes (entre autres) et donc comprendre les récepteurs et corécepteurs utilisés par le VIH. Il doit également comporter les facteurs cellulaires nécessaire à la réPLICATION du virus mais pas les facteurs de restriction qui inhibe cette réPLICATION (Ghimire et al., 2018). Ces facteurs de restriction sont très répandus dans les espèces animales mais le VIH ne s'est adapté qu'à très peu ce qui explique en partie l'incapacité du VIH à se répliquer ou à provoquer une maladie chez la plupart des espèces autres que les humains ou les primates. De par l'origine simienne du VIH, les primates non humains sont le modèle de référence utilisé pour l'étude de l'efficacité des vaccin anti-VIH. Bien que le VIH dérive du SIV du chimpanzé, le fait que peu de chimpanzés infectés par le SIV développent une phase de SIDA et leur statut d'espèce en danger limite leur utilisation dans les études précliniques (Gao et al., 1999). D'autres modèles simiens tels que le macaque rhésus sont alors préférés. Cependant, l'utilisation de primates pose un problème éthique et économique à cause de la taille des animaux, de leur nombre de représentant dans le monde, de leur reproduction et des coûts d'hébergement.

Les objectifs de la vaccination VIH peuvent être divers comme par exemple le test de l'efficacité vaccinale ou l'étude des mécanismes immunitaires. Dans ce deuxième cas, il est inutile que le modèle puisse être infecté par le VIH. Seule la similarité des réponses immunitaires engagées chez l'homme et l'espèce animale est nécessaire. Des modèles de petits animaux plus simples, génétiquement identiques et moins onéreux tels que la souris ou le lapin peuvent alors être utilisés. Les progrès dans le développement d'une myriade de

modèles murins sophistiqués dit « humanisés » dont le système immunitaire se rapproche de plus en plus à celui de l'homme encourage leur utilisation.

Comme dans toute étude, les modèles d'étude préclinique pour une étude globale de la réponse immunitaire au VIH et à la vaccination VIH sont imparfaits. Les modèles d'étude préclinique utilisés, peuvent donc être divers mais toujours en accord avec l'objectif de l'étude préclinique.

2.4.2. Phases des essais cliniques

Après plusieurs études précliniques *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles, le développement d'essais cliniques tout comme la recherche fondamentale sont nécessaires, et pour améliorer les stratégies de vaccination. Les phases cliniques permettent d'identifier des cibles du VIH pour le développement de AcN à large spectre, et d'augmenter la compréhension des mécanismes immunitaires pour la protection contre le VIH. Trois phases cliniques se succèdent lors des essais cliniques avant l'autorisation de mise sur le marché du candidat vaccin. La phase I sert à certifier la sécurité du vaccin chez une petite population de sujets. La phase II permet de déterminer la dose optimale et de démontrer l'efficacité du vaccin sur une population de sujets plus importante. La phase III est réalisée sur une très large population pour tester la reproductibilité des résultats obtenus en phase II. Après avoir passé avec succès ces trois phases, le vaccin candidat obtient son autorisation de mise sur le marché suivie d'une phase IV afin de continuer à surveiller la sécurité et identifier d'autres effets secondaires jusque-là indétectés.

2.4.1. Essais cliniques anti-VIH

Depuis près de 30 ans, la recherche de vaccin contre le VIH-1 a porté six vaccins prophylactiques au stade d'essais d'efficacité de phase II ou III : Vax003, Vax004, HVTN 502 (Step), HVTN 503 (Phambili), RV144 (la cohorte THAI), et HVTN 505 (Lelièvre and Lévy). Malgré tout, aucun n'a réussi à obtenir une autorisation de mise sur le marché et ce malgré la diversité des stratégies vaccinales testées : glycoprotéine recombinées, vecteurs viraux codant pour les gènes gal pol et nef ou encore des stratégies prime-boost. Ces six stratégies avaient également divers objectifs : induction de LT CD8+ cytotoxiques ou d'AcN ; et différentes populations étaient incluses dans les cohortes : utilisateurs de drogues injectables, personnes à fort risque de transmission sexuelle ou des populations générales.

Dans le Tableau 1, j'ai choisi de vous présenter une liste non exhaustive d'essais cliniques récents réalisés chez des adultes non-infectés avec leurs différentes stratégies vaccinales mais toujours par voie intra-musculaire. Les réponses humorales observées sont également listées dont des réponses AcN (Tableau 1).

2.4.2. RV144 (la cohorte THAI)

L'essai RV144 est un essai de phase III qui a débuté en octobre 2003 sur 16402 volontaires du sud-est de la Thaïlande (où la prévalence de l'infection est élevée) âgés entre 18 et 30 ans, séronégatifs le jour du lancement de l'essai et sans comportement à risque. L'objectif était de tester un vaccin candidat à la fois prophylactique, c'est à dire capable de bloquer l'infection par le VIH, et thérapeutique, c'est à dire luttant contre la progression vers le SIDA en cas d'infection. La moitié des volontaires (8197) ont reçu le vaccin candidat et l'autre moitié (8198) le placebo. Ce vaccin candidat consiste en 4 injections de deux vaccins n'ayant pas montré de résultats concluants seuls en phase II chez l'homme, selon le principe du "prime-boost". Pour ce faire, la réponse immunitaire est initiée avec un vecteur recombinant dérivé du poxvirus (ALVAC) exprimant *Gag* et *Pol* d'une souche de sous-type B (souche LAI) et la protéine d'enveloppe gp120 d'un VIH-1 de sous-type CRF01-AE associée à la partie transmembranaire de la gp41 de la souche LAI puis stimulée fortement avec les mêmes immunogènes que ceux contenus dans l'essai VAX003, c'est-à-dire un mélange de deux gp120 recombinantes, l'une de sous-type B et l'autre de sous-type CRF01_AE (AIDSVAX B/E) formulé dans de l'Alum.

Les résultats présentés le 24 septembre 2009 ont montré, pour la première fois dans l'histoire de la vaccination anti-VIH chez l'homme, une protection modeste (31,2 % d'efficacité de protection) contre l'infection (Haynes et al., 2012). Mais cette protection diminue avec le temps, en partie à cause de la faiblesse de l'immunogénicité globale du vaccin. Ces résultats, tout de même encourageants, ont mené à des analyses plus poussées des réponses immunitaires pour l'identification de corrélats de protection.

2.4.3. Corrélats de protection

Bien que l'identification de corrélats de protection requière un vaccin efficace, les 31,2% d'efficacité de l'essai RV144 ont permis de mettre en évidence deux paramètres immunologiques associés à la protection. La présence d'anticorps de classe IgG dirigés contre les régions variables V1/V2 de Env est inversement corrélée au taux d'infection alors qu'à l'inverse, la présence d'anticorps anti-Env de classe IgA est associée au taux d'infection

Identifiants / Sponsor	Date / Phase	Pays de recrutement	Composition des vaccins	Réponse anticorps
HVTN 705 NCT03060629 Janssen Vaccines & Prevention B.V.	2018 Phase IIb	Afrique du Sud, Malawi, Mozambique, Zambie, Zimbabwe	Ad26.Mos4.HIV + gp140 clade C trimérique + Mosaic gp140 + phosphate d'aluminium	En cours Stratégie de prime boost
HVTN 702 NCT02968849 NIAID	2016 Phase IIb-III	Afrique du Sud	ALVAC-HIV (vCP2438) + gp120 clade C + MF59	Essais arrêté pour manque d'efficacité
HVTN 100 NCT02404311 NIAID	2015 Phase I-II	Afrique du Sud	ALVAC-HIV (vCP2438) + gp120 clade C bivalent monomérique + MF59	Production d'IgG restaurée par le boost protéique puis diminue
HVTN 107 NCT03284710 NIAID	2017 Phase I-IIa	SA, Zimbabwe, Mozambique	ALVAC-HIV (vCP2438) + gp120 clade C bivalent monomérique + MF59 ou hydroxyde d'aluminium ou aucun	
HVTN 108 NCT02915016 NIAID	2017 Phase I-IIa	Afrique du Sud, USA	DNA-HIV-PT123 + gp120 clade C bivalent monomérique + MF59 ou AS01B	Forte réponse IgG anti-gp140, gp120, V1V2
HVTN 111 NCT02997969 NIAID	2016 Phase I	Afrique du Sud, Tanzanie, Zambie	DNA-HIV-PT123 + gp120 clade C bivalent monomérique + MF59	La co-administration de l'AND et de protéine est associée à un fort taux d'anticorps anti-V1V2
HVTN 097 NCT02109354 HIV Vaccine Trials Network	2013 Phase Ib	Afrique du Sud	ALVAC-HIV + AIDSVAX B/E gp120 monomérique + hydroxyde d'aluminium	Forte réponse anticorps qui diminue avec le temps
HIV-V-A004 NCT02315703 Janssen Vaccines & Prevention B.V.	2014 Phase I-IIa	Rwanda, Afrique du Sud, USA, Thaïlande, Ouganda	Ad26 MVA + gp120 clade C trimérique + phosphate d'aluminium	Stratégie prime Ad26 boost Ad26+gp140 la plus immunogénique avec induction d'anticorps anti-Env et d'ADCP (80%)
HVTN 073 NCT01423825 NIAID	2009 Phase I	Afrique du Sud	SAAVI DNA-C2 MVA-C Puis Novartis gp140 clade C oligomérique + MF59	Réponse anticorps maintenue 6 mois après le boost protéique Présence d'anticorps neutralisant seulement après le boost protéique
HVTN 086 NCT01418235 HIV Vaccine Trials Network	2011 Phase I	Afrique du Sud	MVA-C + SAAVI DNA-C2 + Novartis gp140 déléte de V2 clade C oligomérique + MF59	Le boost protéique induit de fortes réponses neutralisantes qui diminuent avec le temps.
IAVI W001 NCT03699241 IAVI	2018 Phase I	Kenya, USA	BG505 SOSIP.664 trimérique	En cours
IAVI G002 NCT05001373 IAVI	2021 Phase I		Core-g28v2 60mer + eOD-GT8 60mer	En cours

Tableau 1 : Liste non exhaustive d'essais cliniques anti-VIH récents

Légende : **plasmide ADN**, **vecteur**, **protéine**, **ARNm**, adjuvant ; IAVI : International AIDS Vaccine Initiative ; NIAID : National Institute of Allergy and Infectious Diseases ; inspiré à partir de (Laher et al., 2020; Ng'uni et al., 2020)

(Haynes et al., 2012; Zolla-Pazner et al., 2014). Ces résultats suggèrent que les anticorps qui ciblent les régions V1/V2 et induisent une forte réponse ADCC pourraient être impliqués dans la protection contre l'infection par le VIH mais pas suffisante (Kim et al., 2015). Il a également été montré que la réponse anti-Env globale était plus élevée chez les vaccinés et qu'il n'y avait pas, ou peu de réponse cellulaire anti-Gag chez les vaccinés (non associée à la protection observée). Par ailleurs, 99% des vaccinés ont produit des anticorps anti-Env et plus de la moitié des anticorps anti-Gag, mais ceux-ci s'avèrent être des anticorps peu actifs, bien différents des AcN à large spectre jugés nécessaires pour une protection efficace.

Une multitude d'essais d'efficacité de nouvelles stratégies de vaccination VIH-1 sont toujours en cours pour augmenter l'efficacité de protection observée dans l'essai RV144. Si l'un de ces vaccins s'avérait être efficace, l'étude des corrélats de protection permettrait d'avancer dans la compréhension des mécanismes immunologiques efficaces développés. En attendant, les résultats des essais précliniques fournissent de nombreuses hypothèses quant à ces corrélats de protection et orientent le développement des essais cliniques (Tomaras and Plotkin, 2017).

D'autres types de réponses telles que des anticorps non-neutralisants (Barouch et al., 2015), ou des réponses CD8 polyfonctionnelles (Klatt et al., 2010) ont été rapportées comme associées à une protection contre l'infection VIH dans des tests d'efficacité. L'induction d'IgA dans les muqueuses, porte d'entrée du VIH est également étudiée. Les anticorps neutralisants, bien que n'ayant pas démontré leur nécessité dans l'essai RV144, se sont montrés efficaces dans les phases précliniques. La difficulté réside en leur induction délicate chez l'Homme due au manque de compréhension de leur condition de production.

2.5. Antigène

Lors du développement du vaccin permettant l'induction d'AcN contre le VIH, le premier paramètre à déterminer est l'antigène contre lequel on souhaite diriger la réponse humorale. L'antigène sélectionné doit être une partie du pathogène permettant de limiter l'infection des cellules cibles, soit communément le site d'interaction du virus avec le ou les récepteurs cellulaires. En tant que site d'interaction et machinerie d'entrée dans la cellule hôte, Env ne peut être ni complètement masquée à la surface du VIH ni trop mutée et est conservée pour sa fonction. C'est pourquoi Env est la cible des recherches pour la vaccination contre le VIH. En effet, bien qu'on retrouve des anticorps dirigés contre la

plupart des protéines du VIH, les AcN retrouvés chez certains patients sont uniquement dirigés contre Env. Cependant peu de ces AcN anti-Env ont un large spectre de neutralisation (Burton and Hangartner, 2016).

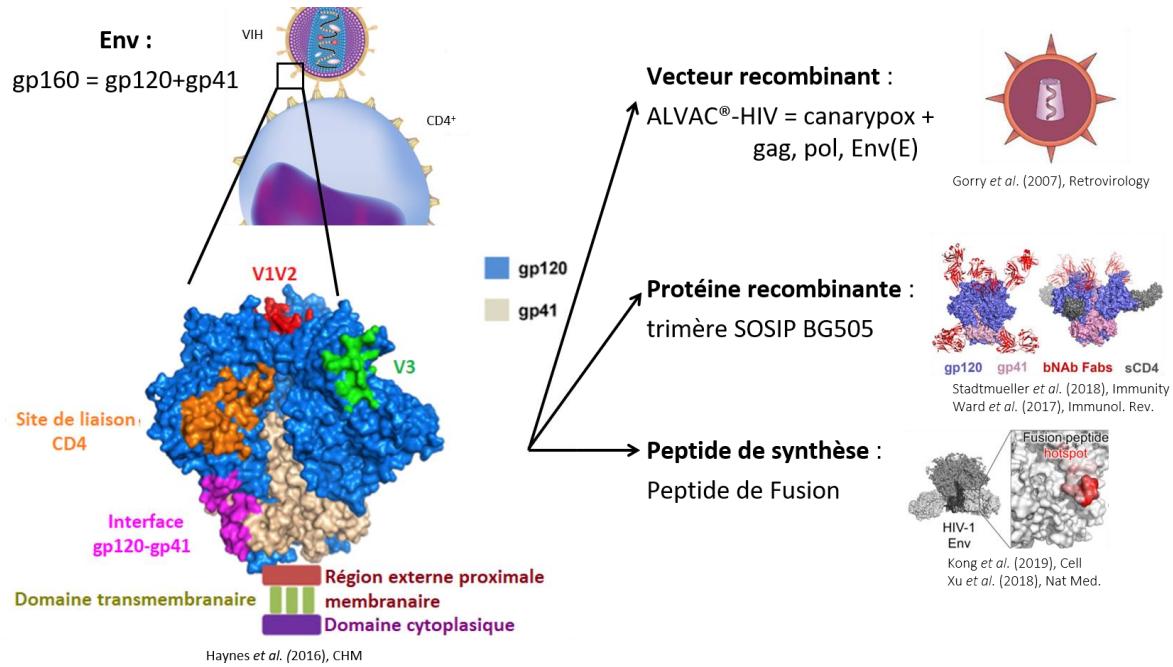


Figure 6 : Sites ciblés par les AcN et utilisés dans les différentes stratégies vaccinales visant à les induire

Les AcN sont principalement dirigés contre les sites mentionnés sur la protéine d'enveloppe Env. Différentes stratégies utilisent ces sites pour induire des AcN par la vaccination.

Une première stratégie repose sur l'identification d'épitopes très conservés entre les différents sérotypes viraux pour le développement d'un vaccin à large spectre. Or dans le cas du VIH, le mécanisme de fusion utilisé par le VIH et l'instabilité de sa liaison gp120-gp41 rendent la production de AcN dirigés contre la gp120 difficile et trouver une cible commune à un maximum de souches de VIH existant est complexe. J'ai participé à la rédaction d'une revue sur les progrès réalisés dans l'identification d'épitopes et le développement de vaccin peptidiques pour l'induction d'anticorps neutralisants à large spectre (annexe 1) (Combadière et al., 2019). De nombreuses études ont portées sur la compréhension structurale de ces AcN et des différents sites ciblés par ces AcN tels que V3-glycan, V1V2-glycan, le site de liaison au CD4 ou encore l'interface gp120-gp41 (Figure 6) (Haynes et al., 2016) pour proposer des stratégies pour leur induction. Des études se sont plus particulièrement intéressées à la gp120 du fait qu'elle contient le site de liaison au CD4 (Ho et al., 1991; Posner et al., 1991). Certaines stratégies de développement de vaccin utilisent

des peptides synthétiques issus de Env tels que le Peptide de Fusion (Xu et al., 2018) ou le peptide W614A-3S, modèle utilisé dans mes travaux et développé par la suite.

Diverses stratégies veulent donc définir une cible précise tandis que certaines équipes ont travaillé sur le design d'un immunogène de conformation identique à l'enveloppe du virus dans son état trimérique et mature, appelés SOSIPs (Binley et al., 2000; Klasse et al., 2018a; Sanders et al., 2002, 2013). Ces trimères ont pour but d'exposer les sites potentiels de neutralisation, déterminé comme un prérequis pour obtenir des bNAbs. De nombreuses équipes travaillent à l'amélioration de la solubilité, la stabilité et l'antigénicité des trimères dont certains tels que le BG505 SOSIP.664 développé par Rogier Sanders ont permis l'induction d'anticorps capable de neutraliser la souche autologue résistante ainsi que des souches plus sensibles à neutraliser dans des modèles précliniques (Aldon et al., 2018; Guenaga et al., 2015; Sanders et al., 2015).

Le développement d'algorithmes capables de prédire les épitopes peptidiques des LB permet l'identification *in silico* de nouveaux épitopes à partir, par exemple, des séquences des AcN à large spectre isolés chez des patients séropositifs pour développer des immunogènes vaccinaux Env (développé dans la revue).

2.5.1. Objectif : diriger la réponse anticorps

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'antigène joue un rôle primordial dans le développement d'un vaccin. Il est essentiel à la maturation des anticorps spécifiques de cet antigène en permettant la sélection des LB présentant un récepteur des lymphocytes B (BCR : « B Cell Receptor ») de haute affinité pour cet antigène. Nous avons également vu que la diversité génétique du VIH est l'obstacle majeur au développement d'un vaccin induisant des anticorps capables de prévenir l'infection des cellules. Afin de pallier cette difficulté, il est nécessaire d'identifier des antigènes qui restent conservés parmi les variants du VIH. On pourrait ainsi induire une réponse immunitaire capable de reconnaître un maximum de variants et donc d'induire une réponse immunitaire à large spectre.

2.5.2. Motif 3S

Le changement de conformation de Env permet l'exposition de la gp41 et notamment du motif 3S, localisé à l'interface entre la membrane cellulaire et la protéine Env (Figure 7) et dont la séquence a été identifiée par le laboratoire conservée dans 77% des souches du VIH

(Pancera et al., 2014; Vieillard et al., 2005a). Sa localisation laisse penser que ce motif peut être important pour la conformation et/ou la fonctionnalité du virus (Vieillard et al., 2005a).

Le laboratoire a décrit que le peptide 3S reconnaît le récepteur de la forme globulaire du facteur du complément C1q (gC1qR) et induit l'expression spécifique de NKP44L sur les cellules CD4+ chez les patients VIH+ (Fausther-Bovendo et al., 2010; Vieillard et al., 2005a). Nkp44L est exprimé à la surface des cellules uniquement dans des conditions de stress (Baychelier et al., 2013). Nkp44L est un ligand du récepteur NKp44 exprimé par les cellules NK et est impliqué dans les processus de lyse cellulaire.

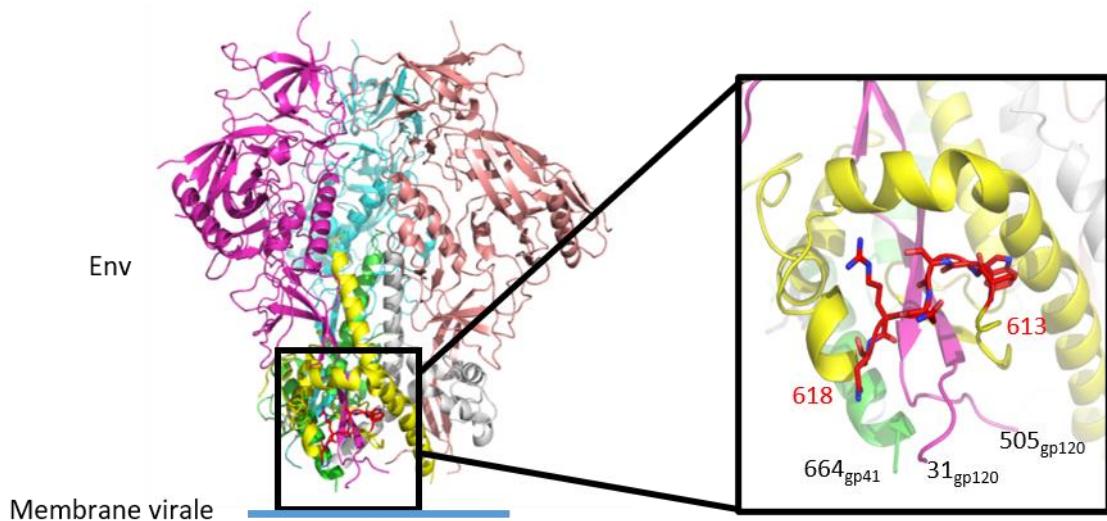


Figure 7 : Localisation du motif 3S

Visualisation réalisée par Peter Kwong du motif 3S représenté en rouge localisé dans la protéine Env entre les positions 613 et 618 (Pancera et al., 2014).

Dans l'infection VIH, Nkp44L est corrélée avec la perte progressive de LT CD4+ ainsi que l'augmentation de la charge virale, et la susceptibilité à la lyse par les cellules NK NKp44+ (Vieillard et al., 2005a). La cellule CD4+ exprimant NKP44L devient alors sensible à la lyse par les cellules NK (Figure 8). Ce mécanisme participe à l'élimination des LT CD4+ au cours de l'infection VIH ainsi qu'à la chronicité de l'infection avec l'augmentation de l'inflammation (Vieillard et al., 2005a).

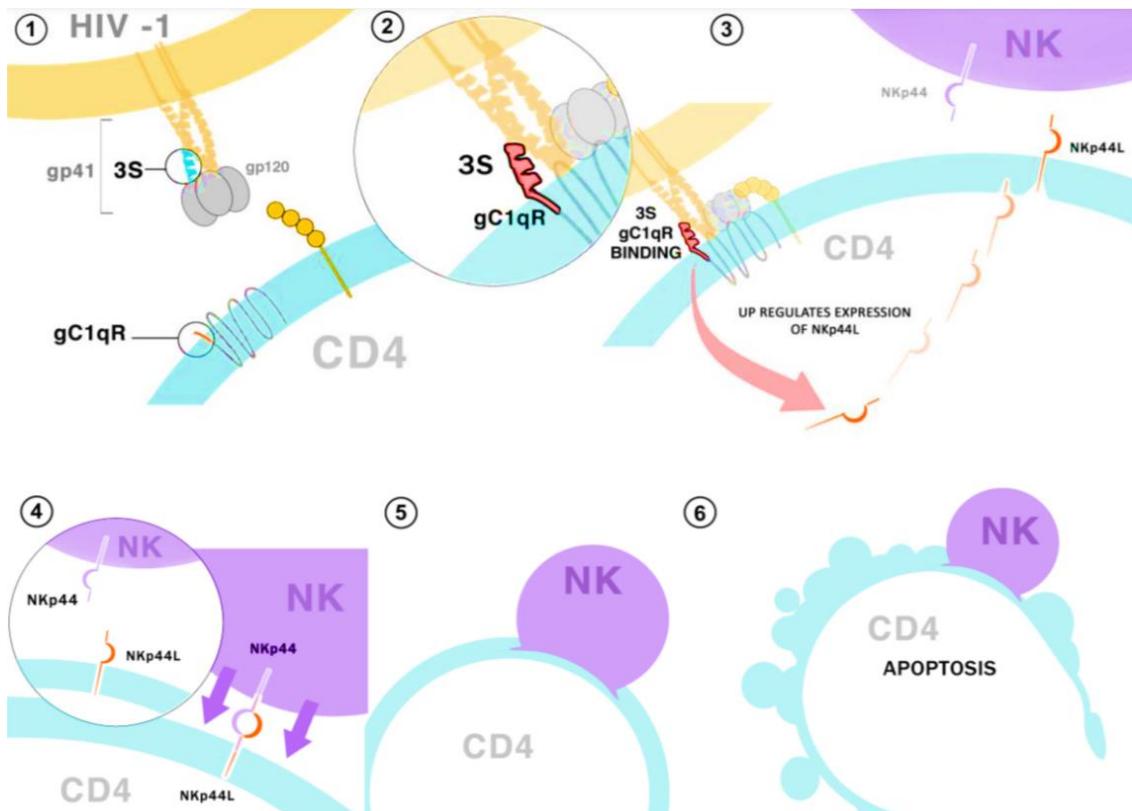


Figure 8 : Mécanisme d'action du motif 3S de la gp41

« La voie pathogénique induite par le motif 3S de la gp41 (3S) responsable de la destruction des cellules non infectées (effet “bystander”) est décrite dans la cascade d’évènements représentée schématiquement ci-dessous: (Etapes 1 & 2) : Liaison de 3S à son récepteur spécifique gC1qR. (Etape 3) : Cascade de signalisation intracellulaire menant à l’expression de NKp44L à la surface des CD4 non infectés. (Etapes 4 à 6) Liaison NKp44L/NKp44. Lyse des CD4 non infectés par les cellules NK conduisant à la déplétion des CD4 et à l’augmentation de l’activation immunitaire et de l’inflammation durant l’infection chronique à VIH » (Calin et al., 2013).

Vaccin thérapeutique

L’objectif d’un vaccin thérapeutique contre le VIH est d’éduquer le système immunitaire pour qu’il élimine efficacement le virus de l’organisme des patients infectés et notamment les LT CD4+.

Dans une étude publiée en 2006, des anticorps spécifiques du peptide 3S sont détectés chez 28,5% des patients infectés par le VIH. La présence de ces anticorps dans le plasma des patients est corrélée au nombre de LT CD4+ et inversement corrélée à l’expression de NKp44L par les LT CD4+ (Vieillard et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la présence d’anticorps anti-3S, et notamment chez des patients ALT, inhibe l’expression de NKp44L par les LT CD4+ et ainsi inhibe leur lyse par les NK NKp44+ ce qui permet le maintien du nombre de LT CD4+ proches de leurs valeurs de base (Vieillard et al., 2006).

D'après l'ensemble de ces résultats, le laboratoire a développé une première stratégie de vaccination thérapeutique basée sur le peptide 3S (VAC-3S) afin d'éduquer le système immunitaire des personnes infectées par le VIH à reconnaître et éliminer efficacement le virus. Cette démarche a pour objectif d'induire par immunisation active la production d'anticorps dirigés contre le motif 3S pour bloquer l'interaction entre le motif 3S et son récepteur gC1qR.

Dans un premier temps, il a été démontré que l'immunisation de macaques avec un peptide 3S de 15 AA induit des anticorps spécifiques du motif 3S. La présence de ces anticorps anti-3S empêche l'expression de NKp44L par les LT CD4+ et inhibe la baisse du nombre de LT CD4+ dans un modèle d'infection de VIH simien (SHIV)162P3 (Vieillard et al., 2008). La stratégie d'immunisation de patients infectés par le VIH avec un peptide 3S semble donc être une piste prometteuse pour bloquer l'interaction 3S/gC1qR et d'ainsi protéger les LT CD4+. La diminution de la perte des LT CD4+ aurait également pour effet de restaurer l'homéostasie immunitaire ainsi que de diminuer l'activation chronique du système immunitaire.

Ainsi, deux études cliniques (phase I et phase IIa) de vaccination thérapeutique chez les patients VIH+ ont apportés la preuve de la sûreté d'utiliser le peptide 3S chez l'Homme. De plus, l'équipe a montré sur la cohorte SEROCO (définie par l'ANRS) que l'injection par voie intramusculaire du peptide 3S-CRM formulé dans du sel d'aluminium (licence Minka Therapeutics) induit la production d'anticorps anti-3S qui permettent de bloquer la translocation de NKp44L et donc de prévenir la déplétion des cellules CD4+ (Vieillard et al., 2010, 2016, 2019).

Vaccin préventif

Suite à ces résultats prometteurs, l'immunogénicité du motif 3S a été étudié par mutagénèse dirigée de type « alanine scan » a été réalisé pour générer des mutants. Pour chaque mutant, un acide aminé de la séquence du motif 3S a subi une mutation ponctuelle et a été remplacé par une alanine. Pour chaque mutant, un acide aminé de la séquence du motif 3S a subi une mutation ponctuelle et a été remplacé par une alanine. Des souris ont été immunisée avec chacun des mutants générés couplés à un protéine carrier KLH et formulé en IFA (Petitdemange et al., 2013a). Chacun des mutants a induit un réponse immunitaire humorale robuste contre la séquence 3S spécifiques par ELISA. La présence de ces anticorps, de même que la présence d'anticorps spécifiques de la séquence 3S non muté

(Petitdemange et al., 2013a), a fortement inhibé l'expression de NKp44L (Petitdemange et al., 2013a) et il a été suggéré que ces anticorps protègent les LT CD4+ contre la lyse par les cellules NK qui expriment NKp44. Curieusement, cette forme de peptide muté n'est pas présente naturellement chez les patients, ce qui peut s'expliquer en partie par la forte conservation de la séquence du motif 3S parmi les souches du VIH.

Après une immuno-purification des anticorps spécifiques, une étude des fonctions de ces anticorps, il est apparu que les anticorps spécifiques de la séquence 3S non muté n'ont aucun activité neutralisante sur les souches virales testées (Petitdemange et al., 2013a). Au contraire, de manière très intéressante, le mutant avec la substitution du résidu tryptophane en position 614 par une alanine (W614A) induit des anticorps capables de neutraliser spécifiquement un large panel de souches virales tiers 1 et tiers 2 de différentes clades (Petitdemange et al., 2013a).

Dans une autre étude, la présence d'anticorps spécifiques du peptide 3S non muté a été détectée chez la moitié (55/106) de patients infectés par le VIH depuis plus de 2 ans et sous traitement ART. Chez ces mêmes 106 patients, des anticorps spécifiques du peptide W614A-3S ont pu être purifiés à partir du plasma de moins de 5% (5/106) d'entre eux. Ces anticorps spécifiques du peptide 3S non muté ou du peptide W614A-3S sont des isotypes IgG et sont détectés exclusivement chez les patients avec un nombre élevé de LT CD4+ [28] et une charge virale indétectable (Petitdemange et al., 2013a). De même que chez la souris, les anticorps spécifiques de la séquence W614A-3S purifiés à parti des plasma des patients ont une activité neutralisante sur l'ensemble des souches virales testées tandis que les anticorps spécifiques du peptide 3S non muté sont incapables de neutraliser ces souches (Petitdemange et al., 2013a).

Une autre étude s'est portée sur 106 patients LTNP de la cohorte Asymptomatique à Long Terme (ALT) qui sont des patients séropositifs VIH depuis au moins 8 ans, dont la numération de LT CD4+ est supérieur à 600/mm³ depuis au moins 5 ans, qui ne présentent pas de symptômes et ne suivent pas de thérapie ARV. Ces patients ont été subdivisés en groupes selon la spécificité des anticorps présents dans leur plasma. Il a été observé que les anticorps spécifiques du peptide W614A-3S d'isotype IgG sont présents dans le sérum de 23,5% des patients.

Les résultats très encourageants des tests de neutralisation effectués avec les IgG anti-W614A-3S purifiés à partir des plasma des LTNP montrent des activités neutralisantes polyfonctionnelles efficaces contre plusieurs souches de VIH (Lucar et al., 2017). De même dans les études précédentes, les anticorps spécifiques du peptide 3S non muté sont incapables de neutraliser ces mêmes souches (Petitdemange et al., 2013a).

Dans cette même étude, tous les patients avec la présence d'anticorps anti-W614A-3S dans leur plasma sont restés non traités 5 ans après leur entrée dans la cohorte. Pour les patients qui n'ont que des anticorps anti-3S non muté ou aucun de ces anticorps spécifiques, environ la moitié d'entre eux ont eu besoin d'un traitement durant cette période (Lucar et al., 2017). De plus, seule la présence d'anticorps anti-W614A-3S est corrélée négativement à la charge virale précocement dans l'infection et associée à la préservation du nombre et des fonctions des LT CD4+ (Lucar et al., 2017). Ces arguments soutiennent l'hypothèse que ces AcN anti-W614A-3S contribuent au statut LTNP. On pourrait étudier plus en détails le rôle de ces anticorps dans la protection contre l'infection VIH avec des expériences d'immunisation *in vivo* ou de transfert passif avec des anticorps anti-W614A-3S chez des macaques.

Pour résumer, les anticorps spécifiques de W614A-3S, qu'ils aient été générés après immunisation chez la souris, ou qu'ils ait été purifiés chez des patients infectés par le VIH, ces anticorps anti-W614A-3S sont capables de neutraliser différentes souches de VIH (Lucar et al., 2017; Petitdemange et al., 2013a). De manière à progresser dans le développement d'un vaccin VIH, l'équipe a testé différentes formulations dans le but d'induire des AcN à large spectre dans des modèles précliniques.

2.5.3. Carrier

Les peptides sont peu immunogènes. Comme décrit plus en détails dans la revue en Annexe 1 (Combadière et al., 2019), à la fin des années 1920, Landsteiner, Avery et Goebel ont montré que coupler des polysaccharides à une protéine dite « carrier » améliore leur immunogénicité. Le couplage de l'antigène à une protéine carrier permet principalement de solliciter l'aide des LT et des LB pour l'induction d'une réponse mémoire durable au vaccin 1 (Combadière et al., 2019; Radtke et al., 2017).

Dans nos études, nous avons sélectionné trois protéines carrier. **CRM** est une toxine diphtérique détoxifiée qui peut être utilisée dans des essais cliniques de même que **KLH**, l'hémocyanine de patelle géante. L'ovalbumine, **OVA**, est largement utilisée dans les essais

précliniques mais étant une protéine rencontrée par l'homme, l'existence d'une immunité préexistante neutralise son intérêt en tant que protéine carrier chez l'Homme pour une stimulation et l'activation. Les protéines carrier ont un effet adjuvant, augmentent l'avidité du vaccin en regroupant spatialement plusieurs antigènes sous forme de complexe comparé aux antigènes seuls plus libres, ce qui a également pour effet de les protéger davantage de la dégradation.

2.6. Formulation du vaccin

2.6.1. Objectifs

Le terme « adjuvant » vient du latin *adjuvare* qui signifie aider, assister. Un adjuvant désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène avec lequel il est administré sans être elle-même la cible. Les adjuvants peuvent être utilisés dans divers contexte tels que les immunothérapies mais ils sont surtout employés comme composant des vaccins.

Le choix d'un adjuvant est un paramètre crucial lors du développement d'un vaccin candidat. Contrairement aux premiers vaccins basés sur des virus ou bactéries entiers (vaccine, rage), et donc assez immunogènes, l'apparition de nouveaux types de vaccins moins immunogènes a nécessité l'ajout d'un composant : les adjuvants. Notamment pour les vaccins sous-unitaires basés sur des protéines, voir sur des peptides, trop peu immunogènes pour induire une réponse immunitaire suffisante pour protéger dans le temps. Il en est de même pour un vaccin inactivé qui ne reproduit qu'en partie l'infection naturelle.

Le principe d'adjuvant a été découvert en 1925 par Gaston Ramon après avoir observé chez des chevaux la présence d'abcès au site d'inoculation de l'anatoxine diphtérique. Ces chevaux produisaient des titres d'anticorps spécifiques plus élevés que ceux qui n'avaient aucun abcès au site d'injection.

Les adjuvants, de par leurs propriétés immunogènes, permettent d'augmenter la force (quantité), la stabilité (perduration), ainsi que la qualité (orientation) de la réponse induite pour une protection adaptée et optimale selon la pathogénèse de l'infection. D'un côté plus pratique, les adjuvants permettent ainsi de réduire le nombre de doses nécessaires. Il est possible de faire varier l'adjuvant d'une formulation vaccinale pour augmenter l'efficacité de protection de certaines populations tels que les personnes âgées ou immunodéprimées et les nouveaux nés dont le système immunitaire est moins compétent.

2.6.2. Diversité des adjuvants

Il existe un grand nombre d'adjuvants de natures très diverses, avec, par conséquent, différents mécanismes d'action et effets sur la réponse immunitaire. Si l'utilisation d'adjuvant a pendant longtemps été empirique, les avancées en immunologie et l'étude des mécanismes d'action des adjuvants a permis de mieux comprendre leurs effets.

Le mode d'action le plus connu est « l'effet dépôt » de certains adjuvants, notamment ceux à base d'huile. Ces adjuvants maintiennent l'antigène au site d'injection permettant une libération lente afin de stimuler le système immunitaire en continu. Les CPA sont ainsi recrutées en grand nombre et la voie alterne du complément est activée en réponse aux signaux de danger qui provoquent une réaction inflammatoire. Pour d'autres adjuvants tels que les sels d'aluminiums, cet effet est très discuté. D'autres mécanismes d'action existent et peuvent avoir un effet direct sur les cellules effectrices de la réponse immunitaire telles que les cytokines, tandis que d'autres sont plus complexe.

La caractérisation des adjuvants est encore loin d'être complète, il est plus simple de les classer selon leur nature et leur origine que d'après leur mécanisme. On peut cependant distinguer les adjuvants immunostimulants, qui se lient directement à différents récepteurs des cellules immunitaires, des véhicules immunostimulants, qui renferment l'antigène pour le présenter. Sans développer toutes les classes d'adjuvants, en voici une liste sommaire.

Les immunostimulants directs

Les ligands des TLRs

Les virus et autres pathogènes sont reconnus par les systèmes de défense innés comme un signal de danger et alertent le système immunitaire de la présence d'envahisseurs. Les CPA, telles que les DC ou les macrophages, sont capables de reconnaître les PAMPs par leurs PRRs, tels que des TLRs. Les TLRs ainsi que leurs ligands sont nombreux et peuvent jouer le rôle d'adjuvant pour stimuler les cellules de la réponse innée et induire une réponse adaptative (Del Giudice et al., 2018). Les plus couramment utilisés dans le développement de vaccins sont :

- La modification structurelle du lipide A du LPS de la bactérie Gram-négative *Salmonella minnesota*, responsable de son activité endotoxique, donne le dérivé **MPL-A** (Thompson et al., 2005). Le MPL-A stimule le TLR-4 qui induit la maturation des DC, l'expansion clonale des LT CD4 + et une réponse Th1 sans les effets inflammatoires du LPS mais à plus

court terme (Ismaili et al., 2002; Kayagaki et al., 2013). Pour dépasser le caractère non soluble dans l'eau du MPL-A, il peut être inclus dans un véhicule tel que les liposomes (Matyas et al., 2013).

- **CpG** sont des oligodeoxynucléotides dont sont dépourvus les génomes des vertébrés mais dont sont riches les génomes procaryotes. Les CpG sont des agonistes du TLR-9 (Tudor et al., 2005). Ils induisent des réponses Th1 et des réponses LT CD8 cytotoxiques. Ils sont souvent utilisés associés à un autre adjuvant tel que l'aluminium ou MF59. Par exemple, dans le vaccin hépatite B (EngerixTM) de GSK Biologicals.
- **Flagelline** liée à l'antigène. Les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes, les cellules NK et les DC expriment TLR-5 (Murthy et al., 2004). Une fois la flagelline reconnue par TLR-5, ces cellules produisent des cytokines et chimiokines pour faire migrer les DC, les LT et les LB vers les Ganglions Lymphatiques Drainants (GLD) (Bates et al., 2009; McSorley et al., 2002; Mizel and Bates, 2010). Plus directement, la flagelline interagit avec TLR-5 sur les cellules CD11c+ et favorise de fortes réponses des LT CD4+ spécifiques à l'antigène pour induire un titre d'anticorps élevé.

Cytokines

Les cytokines sont des protéines qui jouent le rôle d'intermédiaire, de messager, de la réponse immunitaire (Rizza et al., 2002). Tout adjuvant induit une réponse cytokinique. Les utiliser dans des vecteurs plasmidiques en temps qu'adjuvant, ou utiliser des inhibiteurs de cytokines, permet d'orienter précisément la qualité de la réponse immunitaire. La combinaison de GM-CSF, d'IFN- α et d'IL-12 a été utilisées dans des essais de vaccination VIH pour stimuler les réponses CTL (Rizza et al., 2002).

Cependant, aussi attractive que soit l'idée d'utiliser des cytokines comme adjuvant, il faut garder à l'esprit que la dose et l'antigène peuvent changer les effets immunostimulants de certaines cytokines en effets immunosuppresseurs et qu'il peut exister des effets secondaires importants (Carson et al., 1999).

Saponines

En 1936, Thibault et Richou découvrent des propriétés adjuvantes au Quil A, une saponine extraite de l'écorce du Quillaja saponaria d'Amérique du Sud. Une fraction purifiée, le QS21, induit des réponses anticorps importantes (en particulier IgG2a) ainsi que des réponses Th1 et cytotoxique (Newman et al., 1997; Wu et al., 1992).

Les véhicules immunostimulants

Les sels minéraux

L'**aluminium** est un composé inorganique minéral absent dans l'organisme humain. Les adjuvants aluminiques sont les plus utilisés en vaccination (environ 150 vaccins) depuis leur découverte par Glenny en 1926 (Glenny et al., 1926). Le **calcium** peut également être utilisé comme adjuvant. Je développerai les caractéristiques des adjuvants à base d'aluminium dans la suite de l'étude bibliographique.

Les émulsions

On retrouve deux types d'adjuvants huileux. Tous deux contiennent deux phases normalement non miscibles. Un agent tensioactif (ou agents de surface) permet de stabiliser un état de dispersion des deux phases l'une dans l'autre.

Les émulsions classiques « eau dans huile » contiennent des gouttes de solution aqueuse d'antigène hydrophile dans une phase lipophile continue.

- Un exemple est **l'Adjuvant Incomplet de Freund** (AIF), composé d'huile de paraffine et d'Arlacel A (mannide monoleate) comme émulsifiant. L'AIF, version de l'ACF développé par Freund en 1936 dépourvue des corps bactériens de mycobactéries tuées, est l'émulsion eau dans huile de référence pour sa grande efficacité. Bien que moins toxiques que l'ACF, l'AIF induit des ulcères nécrotiques locaux sévères et est donc considérée comme trop毒ique pour un usage chez l'homme. Seul un usage préclinique est accepté. Dans nos études préliminaires avec le peptide W614A-3S-KLH, sa formulation dans l'AIF s'est avérée immunogène dans un modèle murin et a induit des réponses anticorps avec des activités de neutralisation contre différentes souches de VIH. Cet effet a également été montré chez le macaque cynomolgus et chez le lapin (Vieillard et al., donnée non publiées).

Les autres émulsions « huile dans l'eau » sont essentiellement à base de squalène, une huile non toxique métabolisable, et additionné de copolymère synthétique.

- **MF59**, développé par Novartis Vaccines and Diagnostics Inc. licencié en 1997 et utilisé dans les vaccins contre la grippe pour les patients âgés (Fluad®, Novartis Vaccines and Diagnostics, Cambridge, MA, USA). Le squalène est additionné de polysorbate 80 et de sorbitan triolate. Je développerai les caractéristiques de cet adjuvant dans la sous-partie consacrée.

- **AS03**, utilisé dans les vaccins contre la grippe H1N1 (PandemrixTM) et contre la grippe H5N1 (de GSK Biologicals) permet d’élargir le spectre de protection vaccinale à d’autres variants viraux (Roman et al., 2010). Le squalène est additionné d’alpha-tocophérol (vitamine E), un anti-oxydant stimulant les monocytes et les macrophages (Morel et al., 2011).

Les formes particulières

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques autour d'un compartiment aqueux. L'antigène peut être séquestré et protégé dans le liposome ou y être lié de manière covalente. Des molécules immunostimulantes sont soit adsorbées à la surface de la membrane, soit insérées dans la bicouche lipidique, soit contenues dans le compartiment aqueux en fonction de leur caractère hydrophile/hydrophobe (Matyas et al., 2013). La membrane lipidique facilite la fusion du liposome aux membranes cellulaires. Les liposomes permettent alors d’imiter les voies naturelles de présentation au système immunitaire pour une présentation antigénique par les CPA soit directement par la voie endogène après internalisation du liposome soit par la voie exogène. Ils entraînent une réponse mixte Th1/Th2 avec d'une part la différenciation des LB productrices d'anticorps spécifiques et la hausse du taux d'anticorps, et d'autre part une activité cytotoxique des cellules T suivant le type pathogène. Il est important de mentionner qu'en modifiant la taille, la charge et les voies d'injection des liposomes on peut orienter la qualité de la réponse adaptative vers une réponse de type Th1 ou de type Th2 (Bachmann and Jennings, 2010; Mann et al., 2009). Leur composition est ajustée en fonction du pathogène ciblé :

- Les **virosomes** sont des particules virales non réplicatives, et plus particulièrement des liposomes reconstitués avec des glycoprotéines virales isolées pour reproduire le mode de présentation naturel des antigènes viraux et stimuler efficacement les CPA. Deux exemples utilisés en vaccination sont les spicules des glycoprotéines HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase) du virus de la grippe (InflexalTM) ou encore du HAV (EpaxalTM).
- **ISCOMs** : obtenus après mélange de Quil-A®(ou QS21), de cholestérol et de phosphatidylcholine (lipides). La saponine interagit avec le cholestérol pour former une structure complexe capable de créer des pores membranaires. L’ajout de

phosphatidylcholine permet l'incorporation d'un antigène amphiphile par son domaine hydrophobe. Cette formulation induit des réponses LT CD8+ et CD4+.

Pour mon étude, d'après des résultats précédemment obtenus au laboratoire, je me suis plus particulièrement intéressée à deux des adjuvants utilisés en vaccination chez l'homme. L'Alum et le MF-59 like dont je vais vous parler plus en détails ci-dessous.

2.6.3. Alum, sel d'aluminium, hydroxyde d'aluminium

D'abord utilisé sous forme d'alun avec l'anatoxine diphtérique puis l'anatoxine tétanique, l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium l'ont ensuite remplacé dans les vaccins (Coqueluche, Poliomyélite inactivé, Hépatites A et B, Haemophilus, Méningocoque, Papillomavirus). Au vu des milliards de doses injectées à travers le monde depuis presque un siècle, ils sont considérés comme très efficaces, sûrs et bien tolérés.

L'hydroxyde d'aluminium, ou Alum, forme un précipité insoluble de type gel légèrement cristallin et amorphe comprenant à la fois des micro et des nanoparticules, formées par des agrégats poreux de densité variable de cristaux de 4,5x2,2x10nm (Johnston et al., 2002). Les antigènes vaccinaux en solution aqueuse s'adsorbent (notamment par des forces électrostatiques ou par échange de ligand) à la surface des agrégats en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge sans pénétrer dans la structure (Seeber et al., 1991). Cette adsorption protège peu les peptides qui peuvent être exposés à une dégradation protéolytique, et ainsi altérer leur pouvoir d'induire des réponses immunitaires protectrices. Aussi, plus un antigène s'adsorbe, plus la réponse au vaccin est forte.

Les sels d'aluminium induisent une bonne réponse humorale (LB et LT CD4+ Th2) principalement médierée par l'IL-4 et l'IL-5 induisant la sécrétion d'anticorps spécifiques, en particulier les IgG1. En revanche, ils n'induisent peu, voire pas, de réponses cellulaires (Th1 et LT CD8+ cytotoxiques). La production d'anticorps induite par ces adjuvants reste modérée. Le mécanisme précis des sels d'aluminium reste très discuté et notamment leur effet dépôt montré puis démenti après ablation chirurgicale de ces dépôts sans impact sur l'ampleur de la réponse IgG1 (Hutchison et al., 2012). Du côté de la réponse innée, l'utilisation d'une formulation Alum augmente le recrutement des monocytes et la différenciation des DC ainsi que la capture de l'antigène par les DC (Clements and Griffiths, 2002; Gavin et al., 2006; Hutchison et al., 2012; Marrack et al., 2009).

Les adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium induisent une inflammation locale avec recrutement de monocytes et de macrophages (Kool et al., 2008; Mosca et al., 2008) et peuvent, mais pas nécessairement, activer la voie pro-inflammatoire NLRP3. L'activation de l'inflammasome entraîne le recrutement et l'activation des CPA avec une augmentation de l'expression du CMH II et ainsi de la présentation antigénique (Ko et al., 2017). La signalisation de la voie NLRP3 induit la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 par les DC dérivés des monocytes (Franchi and Núñez, 2008). Ces DC participent à la différenciation des LT en Th2 et à l'activation des LB et la production ultérieure d'anticorps (Sokolovska et al., 2007).

2.6.4. Emulsion huile dans l'eau à base de squalène, AddaVaxTM, MF-59[®], SQE

Le squalène est un composé organique naturel, une huile, produite par les plantes, les animaux et présente dans de nombreux aliments. Les huiles d'olive et de palme sont une source de squalène ainsi que le requin, à partir du foie duquel on extrait cette huile à des fins commerciales. Le squalène est également produit par le foie humain comme précurseur du cholestérol et est présent dans le sébum humain.

Les adjuvants similaires au MF-59 sont un mélange de squalène, de polysorbate 80 (Tween 80) et de sorbitan triolate (Span 85). Ces deux derniers sont des tensio-actifs non-ioniques avec une faible balance hydrophile-lipophile pour stabiliser les gouttelettes de squalène auxquelles l'antigène ne se fixe pas.

Deux effets des adjuvants à base de squalène ont été décrits : le premier est un effet dépôt discuté au site d'injection après injection, la phase aqueuse se disperse rapidement, ce qui limite la formation de granulomes et d'abcès. Les gouttelettes d'huile libérées transportent l'antigène directement vers les GLD via les vaisseaux lymphatiques.

Le second est un effet de ciblage des CPA (DC et macrophages). L'injection d'émulsion à base de squalène induit l'augmentation de la sécrétion de cytokines, de chimiokines et d'autres facteurs chimio-attractants par les cellules résidentes du muscle par exemple (macrophages et cellules musculaires). Cet environnement est alors hautement immunocompétent et favorise un fort recrutement des CPA (DC et macrophages). Les CPA présentes en grand nombre au site d'injection rencontrent plus couramment des antigènes et en captent davantage par phagocytose. L'antigène est alors concentré et protégé contre la dégradation dans les CPA qui vont transporter un plus grand nombre d'antigènes vers les GLD. Il en

résulte une plus grande activation des lymphocytes et donc une plus forte réponse acquise (Audibert and Lise, 1993; Cox and Coulter, 1997).

Les adjuvants à base de squalène sont associés à l'induction d'une réponse Th2 et une augmentation du titre d'anticorps (en particulier de l'isotype IgG1 mais aussi IgG2a). C'est notamment le cas du vaccin contre la grippe H1N1 qui induit d'avantage d'anticorps protecteurs 21 jours après injection du vaccin formulé avec MF-59® (Clark et al., 2009). Observation très intéressante, les sujets âgés, chez lesquels il est plus difficile d'induire une réponse immunitaire, ont une réponse anticorps augmentée en réponse à la vaccination contre la grippe avec l'adjuvant MF-59® (Podda, 2001). De plus, l'utilisation du MF-59® dans le vaccin anti-H5N1 a montré une réactivité croisée des anticorps induits par la vaccination et donc un élargissement du spectre de protection à des souches de virus dérivées de celles présentes dans le vaccin (Galli et al., 2009).

2.7. Modalités d'administration

Le calendrier d'injection et la cinétique des doses injectées lors de la vaccination sont importants pour influencer la sélection des LB du CG avec les BCR les plus affins et la maturation des anticorps (Johansen et al., 2008).

2.7.1. Différentes voies d'administration vaccinale

La voie d'administration est un autre défi majeur dans le développement de vaccins sous-unitaires pour induire la cascade cellulaire correcte pour la production de AcN à large spectre. Les vaccins peuvent être administrés par différentes voies par injection ou par voie naturelle (orale ou intra-nasale). Il a été démontré que plusieurs populations de DC contrôlent l'induction des LT auxiliaire folliculaire (Tfh) et, par conséquent, l'activation des LB et les réponses humorales. Selon la voie d'immunisation utilisée, les DC myéloïdes, les DC conventionnelles ou les cellules de Langerhans de la peau contrôlent donc l'induction de la Tfh dans les réponses humorales (Boscardin et al., 2006; Pratama and Vinuesa, 2014).

La plupart des vaccins sont injectés par voie intramusculaire (IM) ou par voie SC. La voie IM est la voie d'administration des vaccins adjuvantés la plus commune et est reconnue comme étant celle générant le moins de réaction locale voire la meilleure immunogénicité dans le cas de la grippe par exemple. Des travaux précédents au sein de l'équipe ont portés sur la voie ID. Elle a pour avantage d'augmenter la concentration en antigènes à proximité des CPA du derme et donc d'induire une plus forte réponse immunitaire ce qui permet de diminuer

les doses à injecter pour obtenir un même effet. Cependant, la voie ID n'est pas compatible avec tous les adjuvants et peut engendrer de violentes réactions locales allant jusqu'à la nécrose.

Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe ont montré qu'en ID, l'injection du peptide 3S muté formulé avec d'IFA ou du Squalène a engendré de trop graves effets secondaires allant jusqu'à une nécrose au site d'injection entraînant l'arrêt immédiat du protocole et le choix de la voie IM pour la suite de l'étude.

2.7.2. Cinétique d'injection

Pour augmenter la qualité de la réponse humorale obtenue après immunisation, différentes stratégies peuvent être utilisées. Une injection de doses croissantes aurait pour effet de mimer la réPLICATION virale (Tam et al., 2016) tandis que l'injection de doses décroissantes permettra d'augmenter la maturation des LB du CG. Le choix des doses injectées peut avoir un impact sur la qualité des anticorps produits. Cependant des résultats non publiés obtenus au laboratoire ont montré que des protocoles d'injection de doses croissantes, décroissantes, exponentielles ou constantes induisent des réponses humorales similaires.

3. Réponse humorale aux vaccins protéiques induisant des AcN

Dans cette quatrième et dernière partie, je vais disséquer la réponse immunitaire thymo-dépendante induite par un évènement immunisant tel que la vaccination prophylactique protéique, conduisant à la production d'anticorps qui peuvent être neutralisants. Dans un premier temps, cette réponse fait intervenir des cellules de la réponse immune innée au site d'injection qui collaborent ensuite avec les cellules de la réponse adaptative dans les Organes Lymphoïdes secondaires (OLII) (Figure 9). La compréhension de ces mécanismes est primordiale pour l'amélioration des vaccins et des stratégies vaccinales.

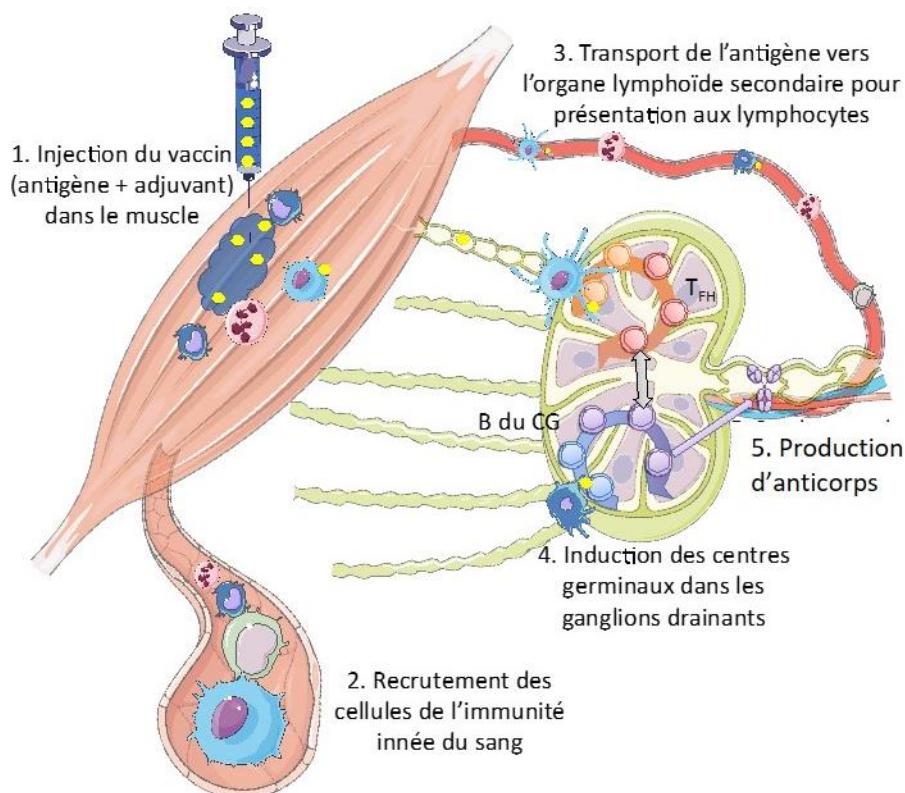


Figure 9 : Schéma général de la réponse immunitaire à la vaccination

Réalisé à partir de smart.servier.com

3.1. Réponse humorale

Les anticorps sont des protéines effectrices, des Ig, synthétisées par les LB et les plasmocytes qui en dérivent. Les Ig peuvent rester liées à la membrane des LB ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire par les plasmocytes. Leur rôle est de maintenir l'intégrité du milieu extracellulaire des toxines, bactéries extracellulaires et virus. Chaque LB possède un épitope, ou déterminant antigénique unique capable de reconnaître un antigène unique. Il existe une

grande diversité de spécificités au sein du réservoir de LB permettant de reconnaître une quasi infinité d'antigènes (Tonegawa, 1983).

Les Ig membranaires sont les récepteurs d'antigènes des LB : le BCR. On en compte environ 100.000 par LB.

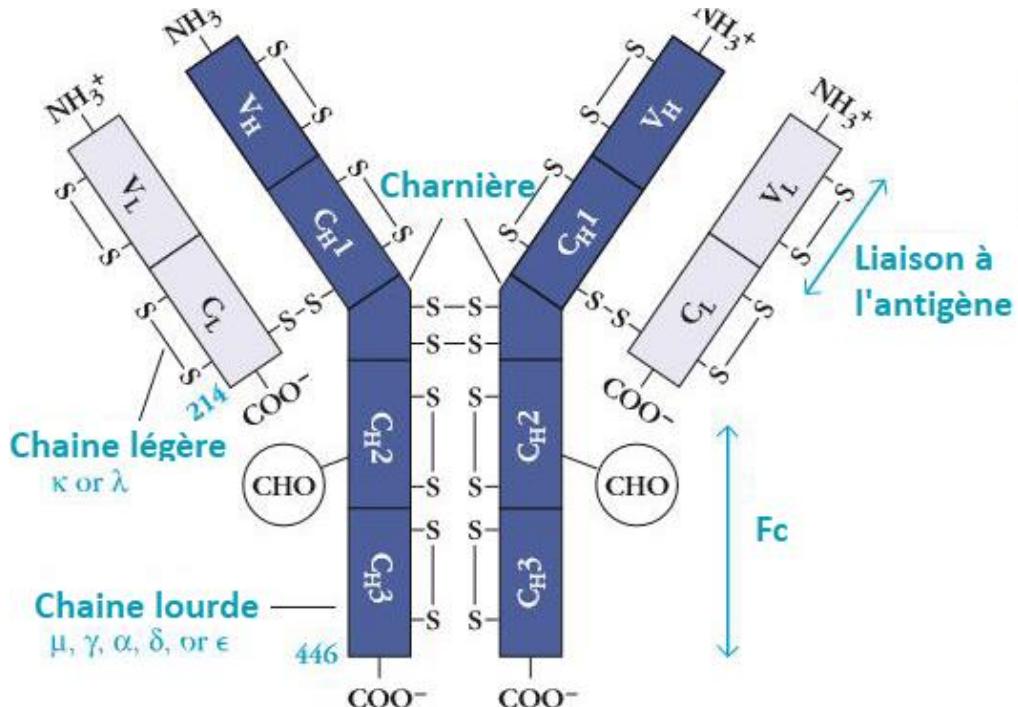


Figure 10 : Structure des immunoglobulines

Traduit à partir de Kuby, Immunology 7th edition

Les Ig sont composées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes identiques entre elles dont une partie est associée de façon covalente aux deux chaînes légères également identiques entre elles (Figure 10). La partie formée uniquement par les chaînes lourdes associées entre elles par des ponts disulfures correspond à la partie Fc (Fragment cristallisable) des Ig. Le gène de la région constante utilisé dans la chaîne lourde définit la classes d'isotypes des Ig (Schroeder and Cavacini, 2010). On distingue 5 classes :

- Les IgM sont la première classe d'anticorps décelée lors de la réponse immunitaire primaire (primo-infection ou première dose de vaccination). Elles ont généralement une plus faible affinité pour l'antigène que les autres isotypes qui les remplaceront après maturation des LB. Les IgM s'organisent en pentamère pour augmenter leur avidité et participer à l'agglutination des antigènes. Elles sont capables d'activer la voie classique du complément (Ehrenstein and Notley, 2010).

- Les IgD pourraient être impliquées dans la différenciation des LB mais leur rôle n'est pas totalement élucidé (Edholm et al., 2011).
- Les IgA sous forme de dimère sont impliquées dans l'immunité des muqueuses, très importante dans le cas du VIH. En effet, les muqueuses génitales ou rectales sont la principale porte d'entrée de l'infection VIH. Le but de certaines stratégies vaccinales est donc d'induire une réponse humorale avec des IgA anti-VIH pour bloquer la transmission au partenaire sain. Le VIH traverse la barrière mucosale par transcytose en interagissant avec le Galactosyl Céramide présent à la surface des cellules épithéliales pour atteindre ses cellules hôtes. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que l'immunisation avec la région conservée de la gp41 nommée P1 qui permet l'interaction avec le Galactosyl Céramide, été capable d'induire des IgA capables de bloquer la transcytose du virus (Alfsen and Bomsel, 2002; Bomsel et al., 2011).
- Les IgE sont impliquées dans les réponses antiparasitaires (notamment des helminthes) et allergiques. En effet, leur partie Fc peut se fixer sur les FcR (récepteurs au Fc) de certaines cellules de l'immunité, comme les mastocytes par exemple, ce qui entraîne leur dégranulation (Galli and Tsai, 2012).
- Les IgG sont impliquées dans la neutralisation des toxines et des microorganismes ainsi que dans la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Elles sont sécrétées par les plasmocytes et représentent la classe d'Ig la plus abondante dans le sérum (Vidarsson et al., 2014). Nous verrons plus en détails leur production, leur rôle et leur intérêt pour la vaccination VIH par la suite.

Les chaînes légères peuvent être de deux types : κ ou λ. L'association de chacune des chaînes légères à une partie d'un chaîne lourde correspond au fragment Fab dont les extrémités N-terminales sont des régions variables qui déterminent la spécificité antigénique par la reconnaissance d'un épitope unique.

3.2. Réponse innée au site d'injection

Suite à l'infection par un pathogène ou une immunisation, la réponse immunitaire innée s'initie rapidement mais de manière non spécifique contre les antigènes de l'agent infectieux. Les cellules circulantes du sang et de la lymphe tels que les DC, les neutrophiles et les monocytes, ainsi que leurs équivalents tissulaires, les macrophages, sont les principales actrices de cette première phase. Elles possèdent des récepteurs capables de reconnaître

des structures typiques de certaines familles de micro-organismes pathogènes, les PAMPs, et de phagocytter des éléments étrangers.

3.2.1. Recrutement et activation cellulaire au site d'injection

Les cellules granulocytes

Les cellules granulocytes sont également connues sous le nom de polynucléaires. Leur nom est dû à leurs noyaux polylobés et la présence de granules cytoplasmiques remplies de médiateurs chimiques et enzymatiques. Les granulocytes regroupent les éosinophiles (impliqués dans les réactions allergiques et dans la lutte contre les parasites), les basophiles (impliqués dans les réactions allergiques) et les neutrophiles dont je vais vous parler plus en détails.

Les neutrophiles

Les neutrophiles sont caractérisés par le l'expression du phénotype Ly6Ghi Ly6C+ CD11b+ chez la souris, et du phénotype CD15+ CD16+ chez l'Homme.

Les cellules d'un tissus blessé, infecté ou injecté lors de la vaccination, synthétisent des cytokines et chimiokines telles que CCL2 pour attirer les cellules effectrices de la réponse innée. Les neutrophiles ont une très bonne capacité à répondre à ces signaux chimiotactiques des processus inflammatoires, notamment grâce à leur expression de CCR2, le récepteur de CCL2. Elles sont donc les premières cellules recrutées sur le site inflammatoire. Les neutrophiles acquièrent la capacité de rouler sur l'endothélium vasculaire, se fixent aux molécules d'adhésion surexprimées en cas d'inflammation et migrent à travers l'endothélium dans les tissus (Chakravarti et al., 2007; Dumas and Pouliot, 2009; Metzemaekers et al., 2020).

Plusieurs processus habilitent les neutrophiles à remplir leur rôle principal : la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et virales par la destruction de ces pathogènes par cytotoxicité non spécifique. Son large registre de récepteurs PRR lui permet de reconnaître une multitude de pathogènes ou de traumatismes. Les agents infectieux peuvent être phagocytés par un neutrophile dont le FcR se lie à la partie Fc des anticorps qui se sont préalablement fixés sur le pathogène dont ils sont spécifiques. Par la suite, le neutrophile dégranule ses composés toxiques et déverse des dérivés oxygénés lors de son explosion oxydative pour détruire le pathogène phagocyté. Mais ces composés sont également délétères pour les tissus de l'organisme une fois libérés. L'activation et le

recrutement des neutrophiles sont donc extrêmement régulés et des premiers mécanismes anti-inflammatoires apparaissent entre 24 et 48h. D'une part le neutrophile excelle dans la phagocytose et d'autre part, il possède un moyen qui lui est propre pour piéger des pathogènes extracellulaires : les NET (Neutrophil Extracellular Traps). Il est capable de projeter son matériel génétique en forme de toile d'araignée dans le milieu extracellulaire pour emprisonner des pathogènes (Metzemaekers et al., 2020).

Le neutrophile intervient aussi dans l'orientation de la réponse adaptative. Il peut participer à l'activation des macrophages et des DC voire capturer des antigènes dans la peau et les transporter dans les GLD (Abadie et al., 2005) ou dans la moelle osseuse (Duffy et al., 2012) pour les transmettre au CPA. Bien que des études *in vitro* ont réussi à montrer que dans certaines conditions de culture les neutrophiles peuvent acquérir des caractéristiques de DC et présenter très efficacement l'antigène aux LT (Oehler et al., 1998), l'absence d'expression de CMH II chez les neutrophiles empêche de les classer comme des CPA.

Les monocytes

Les monocytes sont des cellules sanguines hématopoïétiques qui proviennent de la MO. Ce sont des cellules immunitaires effectrices de par leur activité de CPA. La cytométrie en flux a permis l'identification de cette population relativement hétérogène de par leur forme, leur taille, leur degré de granulosité et leurs marqueurs d'expressions. On peut distinguer deux sous-populations de monocytes : les monocytes classiques (ou inflammatoires) et les monocytes non classiques (ou résidents). Ces deux sous-populations et leurs fonctions spécifiques sont conservées entre différentes espèces, mais les marqueurs spécifiques qu'elles expriment diffèrent (Ginhoux and Jung, 2014; Gordon and Taylor, 2005). Chez l'homme c'est l'expression du CD14 et du CD16 qui permet de différencier les monocytes classiques des résidents tandis que chez la souris c'est le niveau d'expression du Ly6C et du CD43.

Les monocytes classiques ou inflammatoires sont les plus abondants et sont CD14high CD16- chez l'homme et Ly6chi CD43int chez la souris. Ils patrouillent dans le sang et leur expression de CCR2 induit leur recrutement dans les tissus inflammés (tel que le muscle dans notre étude d'immunisation IM) en réponse au gradient de chimiokine produit dans ces tissus tel que MCP-1 (ou CCL2, ligand de CCR2). Les monocytes classiques sont très plastiques et peuvent se différencier soit en DC de type DC inflammatoires dits « dérivés de monocytes », soit en macrophages de type M1 selon le milieu inflammatoire.

Les monocytes non classiques ou résidents sont CD14+ CD16+ CX3CR1hi chez l'homme et Ly6Clo CD43hi chez la souris. Ils patrouillent également dans le sang et expriment CX3CR1 et CCR5 qui leur permettent d'infiltrer les tissus à l'état basal qui produisent constitutivement CX3CL1 et CCL3 pour réapprovisionner les tissus en CPA. Ils sont les précurseurs directs des macrophages résidents des tissus (Geissmann et al., 2003) bien que des précurseurs de macrophages locaux existent également (Yona et al., 2013).

Les macrophages

Les macrophages proviennent donc en partie des monocytes ou sont issus de précurseur embryonnaires (Ginhoux and Guilliams, 2016). Ils sont présents dans tous les tissus du corps y compris le muscle (site d'immunisation de notre étude) et ont une durée de vie bien plus longue que les monocytes ou les DC. Leur capacité de phagocytose participe à l'homéostasie tissulaire (phagocytose des cellules sénescantes, des débris du microenvironnement) et à la protection des cellules contre les infections (phagocytose des pathogènes). Pour combattre les pathogènes, les macrophages sécrètent également des composés toxiques, tels que des dérivés azotés (le monoxyde d'azote), des cytokines pro-inflammatoires, ou encore des enzymes comme l'arginase et l'iNOS. Les macrophages sont de très bonnes sentinelles.

Les macrophages sont aussi une population phénotypiquement et fonctionnellement hétérogène regroupés en deux grandes sous-populations de macrophages (Ginhoux and Jung, 2014; Gordon and Taylor, 2005; Haniffa et al., 2009).

Les macrophages classiquement activés (M1) en condition inflammatoire qui participent à l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil cellulaire de type Th1 et à l'élimination directe des agents infectieux par phagocytose ou par destruction via des composés toxiques comme des anions superoxydes, des dérivés oxygénés et nitrogénés (Mosser and Edwards, 2008).

Les macrophages alternativement activés (M2) correspondent aux macrophages **résidents** dans les tissus à l'état basal et participent au maintien de l'homéostasie, aux processus de cicatrisation et de tolérance et à l'orientation de la réponse vers un profil Th2 par le biais de leur synthèse de CCL22 et CCL17, Ligand du CCR4 (Gordon, 2003; Mosser and Edwards, 2008).

DC

Les DC sont également une population très hétérogène, présentes dans la plupart des tissus à très faible fréquence à un stade immature, notamment la peau et les muqueuses (Haniffa et al., 2012). Tout comme les macrophages, elles ont un rôle de sentinelle de par leur localisation stratégique, leur grande mobilité et leurs dendrites qui leur permettent de sonder leur microenvironnement (Banchereau and Steinman, 1998). Le large éventail de PRR exprimé par les DC tels que les TLR leur permet de reconnaître la grande majorité des catégories de pathogènes par leur PAMPs (Cerboni et al., 2013). Cette diversité induit l'activation de multiples voies de signalisation et par conséquent la production de différentes cytokines et chimiokines pour stimuler et orienter la réponse immunitaire. Elles ont également un rôle important dans l'induction d'une réponse tolérogène à certains antigènes du non soi, comme la flore commensale, ou aux antigènes du soi. L'hétérogénéité de la population de DC la rend difficile à classifier. Elles sont divisées en sous-populations en fonction de leur localisation et de leur état de maturation : les mDC (ou cDC), les pDC ou encore les cellules de Langerhans (Ueno et al., 2007). La principale fonction des DC est de présenter les peptides antigéniques associés aux molécules du CMH I ou CMH II aux LT pour les activer. Ainsi, les populations de DC sont des CPA dites « professionnelles » et sont identifiables à leur forte expression du CMH II.

Les pDC forment une population homogène relativement rare. Elles sont absentes dans les tissus périphériques à l'état basal, circulent en faible quantité dans le sang et pénètrent dans les OLII où elles sont plus abondantes. Ces cellules sécrètent notamment de l'IFN de type I (IFN- α , IFN- β) suite à leur activation.

Les mDC sont, elles, une population très hétérogène. Selon leur localisation, l'expression de leurs marqueurs varie ainsi que leur état d'activation et de maturation, leur expression de TLR et leur capacité à stimuler des LT varient. On peut cependant les classer en deux populations différenciées par l'expression de CD1c (BDCA-1) ou de CD141 (BDCA-3). Les mDC CD1c excellent dans la stimulation des LT CD4+ naïfs et orientent leurs réponses contre les pathogènes extracellulaires, vers un réponse de type Th-17 ou de type Th-2 (Schlitzer et al., 2013). Les mDC CD141 induisent des réponses LT CD4+ de type Th-1 et peuvent également capturer des cellules infectées et apoptotiques pour les présenter aux LT CD8+ (Villadangos and Shortman, 2010).

Les cellules de Langerhans sont présentes dans la peau et les épithéliums (du vagin, du rectum, de l'anus) à un stade immature. Elles sont caractérisées par la présence de granules dites de Birbeck et par la forte expression de la langerine, une lectine de type II permettant notamment la capture d'antigènes glycolipidiques tels que la gp120 du VIH. Après contact avec les antigènes, elles s'activent et acquièrent la capacité de migrer vers les OLII où elles deviennent matures et capables de présenter les peptides antigéniques aux LT.

3.2.2. Prise en charge de l'antigène, maturation et migration vers les GLD

Les macrophages et les DC sont des CPA. En grande majorité, ce sont les DC, les CPA professionnelles, qui capturent l'antigène au site d'infection ou de vaccination par phagocytose, endocytose ou macropinocytose. Après capture de l'antigène, les CPA l'apprettent et le présentent, associé aux molécules du CMH I ou CMH II aux lymphocytes, cellules de la réponse adaptative, dans les OLII. Ces cellules font donc le pont entre la réponse innée et la réponse adaptative.

Après capture de l'antigène, les DC immatures sont activées par des signaux tels que des cytokines pro-inflammatoires libérées dans le microenvironnement (IFN type 1, IL-1 β et le TNF- α), des PAMPs, des signaux délivrés par des LT ou des cellules nécrotiques (Basu et al., 2010). Suite à ces signaux, les DC deviennent matures par plusieurs phénomènes concomitants (Haniffa et al., 2012).

D'une part, les CPA acquièrent un phénotype leur permettant de migrer vers les organes où s'initie la réponse adaptative, c'est-à-dire les OLII tels que les GLD (ou la rate) (Butcher and Picker, 1996; McColl, 2002). Cette migration peut se faire par plusieurs voies. Le sang transporte principalement les lymphocytes, les DC résidentes immatures et monocytes inflammatoires jusqu'au ganglion où ils arrivent par les vaisseaux sanguins HEV (High Endothelial Venule). Pour ce faire, l'expression de CCR7, le récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21 exprimées par les cellules endothéliales des HEV, augmente à la surface des DC matures, de même que les intégrines CD58 et CD54 nécessaires pour la transmigration.

Les DC matures qui apportent l'antigène migrent quant à elles par la lymphe et parviennent dans le GLD à travers les vaisseaux lymphatiques afférents. La lymphe peut également acheminer l'antigène jusqu'au GLD par drainage passif. Les GLD sont de véritables filtres. Ils drainent la lymphe pour concentrer les antigènes où sont localisées les cellules spécifiques

de l'antigène et optimisent donc les rencontres entre les cellules devant collaborer pour une réponse immunitaire efficace.

D'autre part, les CPA augmentent leur expression de CMH I et II, des molécules de costimulation indispensables à l'activation des LT, comme CD80, CD86 et CD40 (Haniffa et al., 2012). Ce changement phénotypique s'accompagne d'un changement fonctionnel avec la diminution importante de la capacité des DC à capturer l'antigène (Banchereau and Steinman, 1998; Salomon and Bluestone, 2001).

3.3. Interface entre la réponse innée et acquise dans les GLD

Après une réponse immunitaire innée rapide mais non spécifique des antigènes du pathogène, les CPA vont initier une réponse immunitaire adaptative. Les cellules effectrices de la réponse adaptative humorale sont les LB, souvent aidés par les LT. Ils reconnaissent spécifiquement des antigènes pathogènes et sont capables de se différencier en cellules mémoire aptes à réagir plus rapidement lors d'une seconde rencontre avec l'antigène. La réponse adaptative est donc caractérisée par sa spécificité antigénique et sa mémoire.

Pour se faire, une fois arrivées dans les OLII tel que le GLD, les cellules de la réponse innée se déversent à travers le sinus et vont activer les cellules (lymphocytes) spécifiques des antigènes de l'agent infectieux, qui vont alors proliférer. Ces lymphocytes sont naïfs et inactivés tant qu'ils n'ont pas rencontré l'antigène dont ils sont spécifiques.

Les GLD (Figure 11) sont composés en très grande majorité de LT et LB, ainsi que de CPA bien moins nombreuses. Toutes ces cellules s'organisent en deux zones principales. La première est la médulla, la zone la plus interne, où sont localisées les macrophages et les cellules mémoires. Autours de celle-ci, la seconde zone, le cortex est scindé entre la zone T et les follicules B, qui peuvent être de deux natures. Le follicule B est au départ un follicule primaire regroupant des LB qui, suite à leur activation par leur antigène spécifique, va devenir un follicule secondaire, appelé CG, au sein duquel les LB se différencient et se multiplient pour la production d'anticorps de haute affinité (von Andrian and Mempel, 2003; Butcher and Picker, 1996).

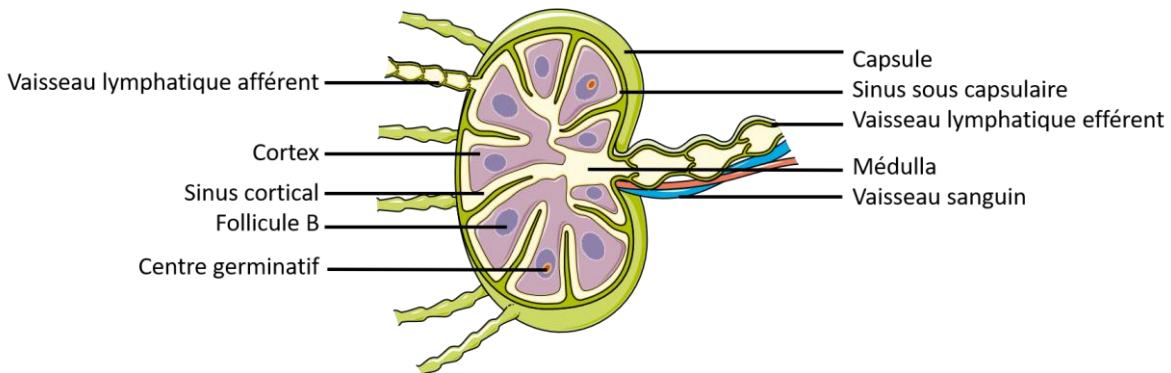


Figure 11 : Schéma d'une coupe de ganglion lymphatique

Réalisé à partir de smart.servier.com

3.3.1. Apprêtement et présentation de l'antigène

Les CPA migrent de manière CCR7-dépendante dans le GLD par les vaisseaux lymphatiques afférents présents à de multiples sites à travers la capsule pour présenter les antigènes capturés au site inflammatoire aux lymphocytes et ainsi les activer. Les DC qui migrent vont se positionner de préférence dans les zones T et la zone inter folliculaire. Les DC résidente du sinus sous-capsulaire immatures, mais également les macrophages sous-capsulaires et les LB, sont quant à eux positionnés stratégiquement à proximité des vaisseaux lymphatique pour capturer des antigènes qui ont été drainés passivement jusqu'au GLD plus rapidement. Ces cellules apprêtent ensuite ces antigènes de manière à pouvoir présenter à leur surface des épitopes de l'antigène associés aux molécules de classe I ou II du CMH pour activer les cellules de la seconde ligne de défense, les cellules de la réponse adaptative, les lymphocytes (Rosenthal and Shevach, 1973). Une fois leur mission de présentation de l'antigène accomplie, les CPA ressortent du GLD par le canal lymphatique efférent. Il existe plusieurs mécanismes d'apprêtement et de présentation.

La voie exogène est réservée aux cellules phagocytaires pour des peptides provenant du milieu extra-cellulaire (Amigorena, 1999). Les molécules issues des corps apoptotiques ou des agents pathogènes tels que des bactéries ou des parasites internalisés par phagocytose sont dégradées en peptides de 11 à 14 AA dans des endosomes (ou phagosomes) qui fusionnent avec des vésicules contenant le CMH II préalablement synthétisés dans le réticulum endoplasmique avec un fragment CLIP associé à la cavité de liaison au peptide. Ce fragment CLIP provient du polypeptide à chaîne invariante complexé avec les deux chaînes du CMH II lors de son assemblage dans le réticulum endoplasmique qui a été clivé par la

cathepsine S dans le compartiment endocytaire. Les peptides remplacent CLIP lors de la fusion des vésicules et le complexe CMH II-peptide est exporté à la surface de la membrane plasmique de la CPA (Figure 12) (Dijkstra and Yamaguchi, 2019). Les LT CD4+ reconnaissent ce complexe et s'activent.

Des antigènes exogènes peuvent également être présentés par les CPA associés au CMH I lors de cross-présentation et activer efficacement la réponse cytotoxique (Haniffa et al., 2012; Joffre et al., 2012) ou être acquis directement à leur surface un complexe CMH I-peptide présent à la surface d'une cellule phagocytée par un phénomène de cross-dressing pour activer plus efficacement les LT CD8+ (Dolan et al., 2006)(Dolan et al., 2006). Par cross-présentation, les cellules sont ainsi capables de présenter des antigènes exogènes, qui sont normalement présentés par le CMH II à la surface des cellules dendritiques, et ainsi de rester non infectées, tout en induisant une réponse cytotoxique. La cross-présentation est donc importante pour les stratégies de vaccination avec des antigènes protéiques.

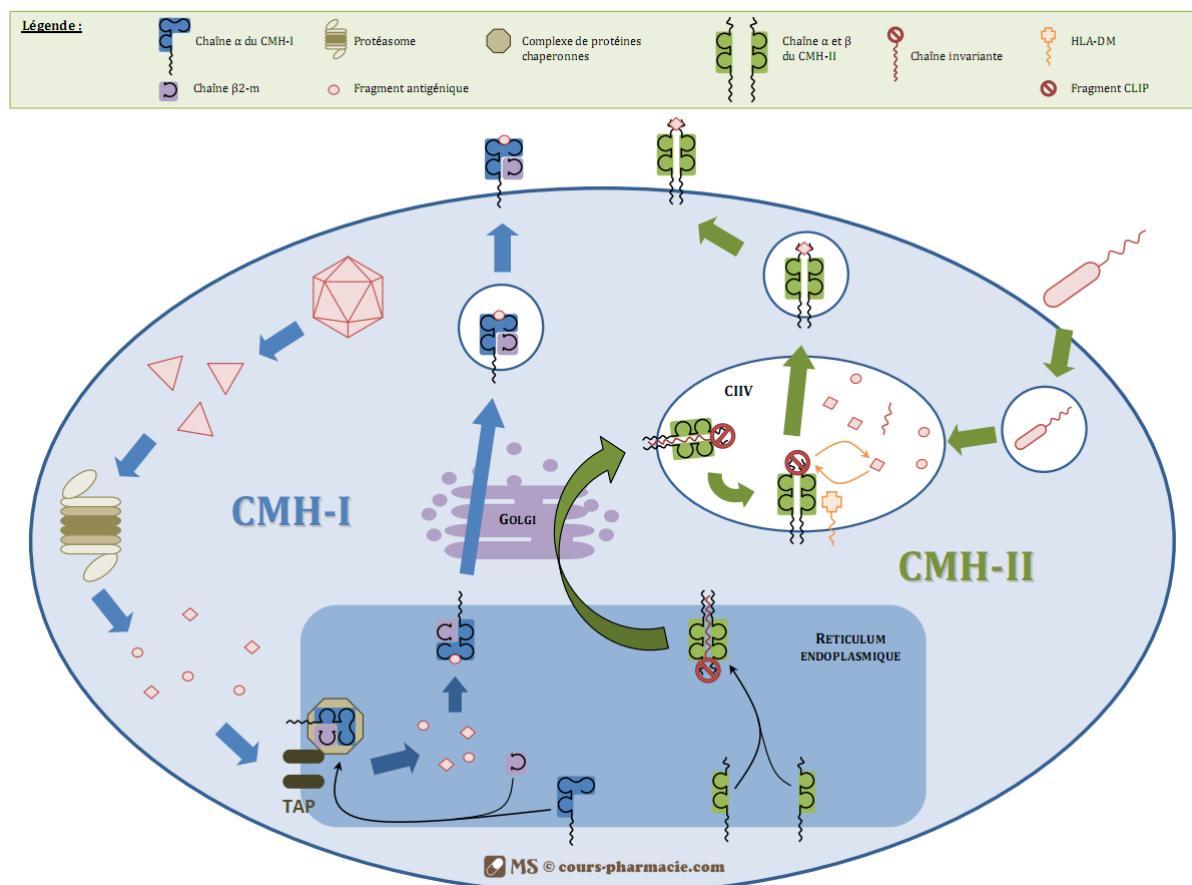


Figure 12 : Mécanismes d'apprétement et de présentation de peptides associés au CMH I ou au CMH II par les cellules

A partir de cours-pharmacie.com

De son côté, la [voie endogène](#) est exploitée par toutes les cellules nucléées de l'organisme. Elle permet de présenter des peptides issus du cytoplasme des cellules. Les protéines dont sont issus ces peptides peuvent correspondre à des protéines du soi et être impliquées dans le mécanisme de tolérance immunitaire, à des protéines tumorales ou à des protéines virales produites par la cellule. Ces protéines sont dégradées par le protéasome en peptides d'une vingtaine d'AA. Les pompes TAP permettent le transport du peptide du cytosol vers le réticulum endoplasmique. Dans le réticulum endoplasmique les peptides sont chargés dans le sillon de fixation des peptides des molécules du CMH I grâce à des protéines chaperonnes. Les protéines chaperonnes se détachent puis le complexe CMH I-peptide est expédié à la membrane cytoplasmique (Figure 12). La présentation de peptides, d'origine virale par exemple, associés au CMH I par des CPA permet l'interaction et l'activation des LT CD8+ (Zinkernagel and Doherty, 1974) en LT cytotoxique.

Lors du recyclage des constituants cellulaires par autophagie, la cellule capture du matériel cytoplasmique qui est dégradé dans des lysosomes et les peptides générés peuvent être présentés par les CMH II. De plus, le groupe de Munz a démontré que des peptides issus de l'infection par le virus Epstein Barr peuvent être transférés dans des autophagosomes et présentés par les CMH II. Ainsi, des peptides endogènes issus de l'infection des cellules par des virus ou autres micro-organismes intracellulaires peuvent être présentés par le CMH II et être une source d'antigène pour l'activation des LT CD4+ (English et al., 2009; Münz, 2016).

3.3.2. Activation et différenciation des LT en Tfh

Les LT sont des cellules effectrices de l'immunité adaptative. Bien qu'il existe des réponses humorales T-indépendantes, pour une réponse humorale efficace et durable contre un antigène protéique, l'aide des LT CD4+ est requise (Crotty, 2015). Cette aide a été mise en évidence en 1960-70 (Miller and Mitchell, 1968).

Les précurseurs hématopoïétiques des LT sont générés dans l'Organe Lymphoïde primaire (OLI) qu'est la MO, mais contrairement aux LB qui matures entièrement dans les MO, des progéniteurs T immatures, les pré-thymocytes, sortent de la MO pour rejoindre le thymus. La spécificité antigénique des LT est déterminée dans ce deuxième OLI, lors de l'acquisition de leur TCR, le récepteur spécifique à l'antigène, et du processus de la sélection qui permet leur maturation. Après ces premières étapes, les LT quittent le thymus sous forme de cellules naïves. On distingue deux types de LT caractérisés par l'expression soit de CD4 (LT CD4+) soit de CD8 (LT CD8+). A l'état basal, en l'absence d'inflammation, les LT matures et

naïfs patrouillent l'organisme par le sang, en passant dans les OLII jusqu'à la rencontre de leur antigène. Dans les OLII, les LT naïfs ont besoin de recevoir trois signaux délivrés par les CPA matures et le microenvironnement pour pouvoir s'activer, se polariser et initier une réponse effectrice.

3 signaux d'activation

Les TCR permettent aux LT de reconnaître des antigènes étrangers qui leur sont présentés par les CMH (contrairement aux LB qui reconnaissent directement l'antigène). Leur rôle est donc primordial pour la défense contre les pathogènes. Pour reconnaître un maximum d'antigènes de pathogènes, les TCR doivent donc former un réservoir d'une extrême variabilité. Chaque LT va donc avoir à sa surface un TCR qui lui est propre et qui lui permet de reconnaître un unique antigène. Une multitude de copies de ce TCR unique est présent à la surface de chaque LT.

Cette diversité de répertoire est due à la combinaison d'un nombre limité d'éléments, de fragments, et non pas à un grand nombre de gènes codant chacun pour un TCR donné. La chaîne α du TCR est formée en associant les uns aux autres un des segments variables $V\alpha$, un des segments jonctions $J\alpha$ aux segments communs $C\alpha$. De la même manière, la chaîne β du TCR est formée en associant un des segments $V\beta$, un des segments $J\beta$ aux segments $C\beta$, ainsi qu'un segment supplémentaire parmi les segments de diversité $D\beta$. La chaîne β s'associe comme suit : $V\beta-D\beta J\beta-C\beta$. Les recombinaisons sont effectuées par un complexe enzymatique à l'aide de séquences-signal de recombinaison (RSS) présentes de part et d'autre des segments de gènes V, D et J codant pour les chaînes α et β du TCR (Chien et al., 1984). La réaction est initiée par les deux enzymes indispensables RAG-1 (Recombination Activating Gene-1) et RAG-2 exprimées uniquement dans les cellules de la lignée lymphoïde (McBlane et al., 1995).

Le premier signal nécessaire à l'activation des LT est la reconnaissance par le TCR du complexe peptide dont il est spécifique associé au CMH des CPA. L'intensité de ce signal dépend du niveau d'affinité entre l'antigène et le TCR. Les LT CD4+ reconnaissent des peptides de 11 à 14 AA dérivés de la dégradation d'antigènes exogènes et présenté par le CMH II sur les CPA. Les LT CD8+ quant à eux reconnaissent des peptides de 8-10 AA présentés par leur CMH I. Les DC et plus particulièrement les DC inflammatoires, sont les CPA spécialisées pour l'activation et l'induction de la prolifération des LT naïfs en leur présentant l'antigène dont ils sont spécifiques (Geissmann et al., 2003).

Pour activer un LT et stabiliser l'interaction avec la DC, un deuxième signal est nécessaire : la **costimulation**. Si un LT reçoit seulement le premier signal TCR, celui-ci est inactivé par anergie (incapacité à répondre à une nouvelle stimulation antigénique) ou déleté et ce qui conduit à la tolérance de l'antigène présenté. L'engagement de la molécule CD28 présente à la surface des LT avec les molécules de costimulation CD80/CD86 exprimées à la surface des CPA permet la survie des LT (augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques tel que Bcl-xL) et leur expansion pour une prolifération productive. Cet engagement est le mieux caractérisé mais n'est pas le seul signal de costimulation. Les signalisations ICOS/ICOSL, CD40L/CD40, OX40/OX40L ou LFA-1/ICAM-1 favorisent également l'activation des LT tandis que l'interaction PD1/PDL1 a un effet inhibiteur (Chen and Flies, 2013).

Un dernier signal permet d'orienter la réponse T effectrice. Les **cytokines** sécrétées par les cellules de l'environnement local et les DC induisent des phénotypes et fonctions spécifiques des LT. Les LT se différencient en sous-populations de LT.

Activation des LT CD4 et différenciation en Tfh

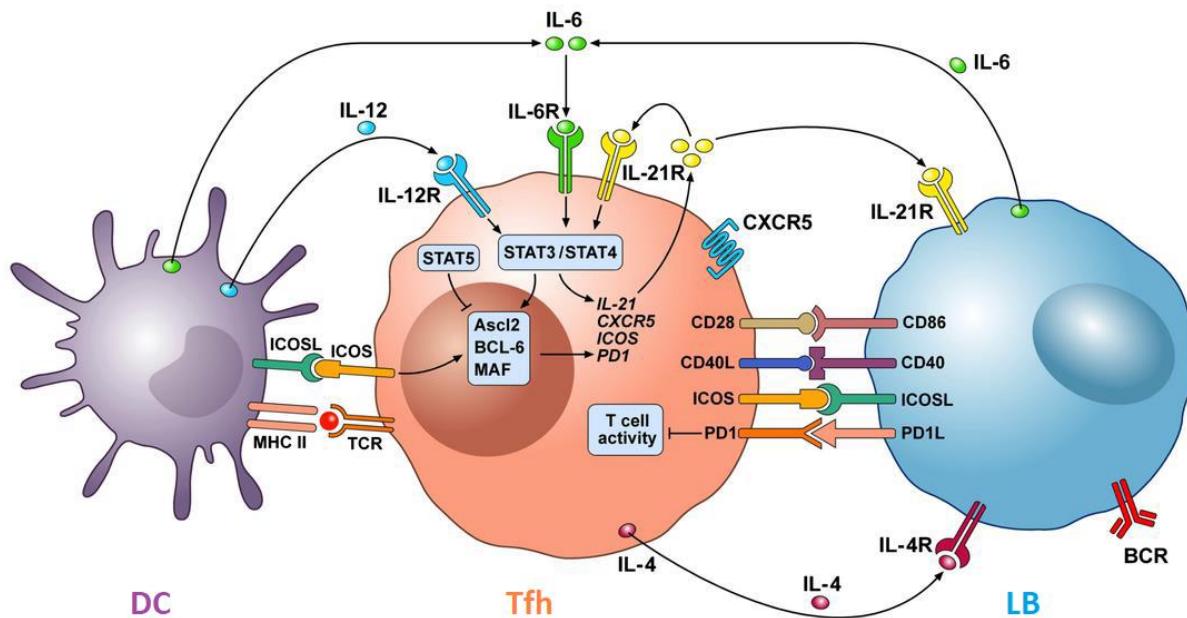


Figure 13 : Signaux de différenciation des Tfh

A partir de (Varricchi et al., 2016)

Dans notre cas de vaccination VIH, l'objectif est d'induire une réponse anticorps protectrice neutralisante à long terme. Les Tfh sont connus pour avoir un rôle essentiel dans l'induction d'une réponse anticorps depuis les années 2000 et sont reconnus pour être LA population spécialisée dans le soutien des LB (Crotty, 2011, 2015; Vinuesa et al., 2016).

Les Tfh sont caractérisés par l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR5, de PD-1 et du facteur de transcription Bcl-6. Les Tfh expriment les co-stimulateurs CD40L et ICOS et secrètent de l'IL-21 (Nurieva et al., 2009).

La différenciation des LT CD4 en Tfh est un processus qui implique plusieurs facteurs de transcription ainsi qu'une succession d'interactions spatio-temporelles avec les DC pour leur transmettre les trois signaux évoqués précédemment (Crotty, 2014). Dans la zone T des OLII, la présentation de l'antigène par les DC aux LT CD4 naïfs doit induire un **signal TCR** (premier signal) intense pour induire la différenciation (Fazilleau et al., 2009a). La quantité d'antigène au départ détermine l'amplitude et la durée de la réponse Tfh (Baumjohann et al., 2013). Par la suite l'antigène doit être exposé et présenté par les LB (principales cellules des CG) en continu pour maintenir le phénotype Tfh (Deenick et al., 2011). En parallèle, les signaux de costimulations tels que CD28, OX40 et ICOS (deuxième signal) induisent l'expression du facteur de transcription **Bcl-6**, essentiel à la différenciation en Tfh (Figure 13) (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu and Vinuesa, 2010; Yu et al., 2009). L'expression de Bcl-6, ainsi que de Ascl2 et Maf promeuvent l'expression de **CXCR5**, un récepteur couplé aux protéines G essentiel à la migration dans les follicules B des OLII riches en son ligand, la chimiokine **CXCL13** (Ansel et al., 1999). CXCL13 est sécrétée par les Tfh (chez l'Homme), les LB du CG et les FDC et est primordiale pour définir et maintenir l'architecture fonctionnelle des CG (Kim et al., 2004). L'expression de Bcl-6 induit la diminution de celle de CCR7, qui, couplé à l'augmentation de l'expression de CXCR5, permet la migration dans les follicules (Haynes et al., 2007). L'interaction **ICOS-ICOSL** permet également la migration des Tfh vers la zone inter-folliculaire. Le troisième signal est délivré par un mélange de cytokines et non par une seule cytokine ce qui rend leur induction et leur étude plus délicates. Les cytokines **IL-6** et **IL-21** combinées jouent un rôle central dans l'orientation des LT CD4 vers une différenciation Tfh (Figure 13). En effet, in vitro et in vivo, l'IL-6 et l'IL-21 augmentent l'expression de Bcl-6 au sein des LT CD4 nouvellement activés tandis que l'absence d'IL-6 induit un défaut précoce dans la différenciation en Tfh (Nurieva et al., 2008). L'**IL-27** peut également augmenter la sécrétion d'IL-21 et ainsi favoriser la formation et le maintien des cellules Tfh.

L'**IL-2** quant à elle inhibe précocement cette différenciation par la voie STAT5 via le facteur de transcription Blimp-1 (Johnston et al., 2012). Blimp-1 régulé positivement supprime l'expression de CXCR5, Bcl-6 et IL-21 ainsi que de **cMaf** et **Baft**, deux autres facteurs de

transcription nécessaire à la différenciation Tfh (Nurieva et al., 2009). Dans ce sens, une faible expression de l'IL-2R associée à un fort signal ICOS chez les LT pré-activés induit une différenciation Tfh.

Comme nous le verrons par la suite plus en détails, le rôle essentiel des Tfh est d'aider à l'activation des LB, à la formation du CG, à la sélection et maturation par affinité des anticorps, au développement de plasmocytes à longue durée de vie et des B mémoire et pour finir à la mise en place de la réponse B mémoire si besoin.

3.3.3. Activation des LB

Les LB sont les principaux acteurs de l'immunité adaptative humorale spécifique grâce aux anticorps qu'ils produisent après différenciation en plasmocytes. Les précurseurs hématopoïétiques des LB sont générés dans la MO. La spécificité antigénique des LB est déterminée dans cet OLI, lors de la première étape de maturation des LB pendant laquelle ils acquièrent leur BCR composé d'une Ig ancrée dans la membrane associée à un hétérodimère Ig α -Ig β . L'Ig permet de reconnaître l'antigène directement sous sa forme native contrairement aux LT qui reconnaissent des peptides de l'antigène présentés par les CMH tandis que le dimère est impliqué dans la transduction du signal dans la cellule.

Après cette première phase précoce de développement indépendante de l'antigène, les LB quittent la MO sous forme de cellules naïves IgM+ IgD+. Pour rencontrer leur antigène spécifique, les LB naïfs matures circulent à travers le sang dans l'organisme entre les OLII (Batista et al., 2001). Au sein des GLD, les LB naïfs sont localisés dans les follicules B pour rencontrer leur antigène spécifique (Batista and Harwood, 2009).

Les DC folliculaire (FDC) jouent un rôle primordial dans l'architecture des follicules. Contrairement aux DC qui sont des cellules hématopoïétiques et qui dérivent de progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes, les FDC sont d'origine stromale et semblent dériver de précurseurs mésenchymateux. Les FDC possèdent des dendrites tout comme les DC mais elles n'expriment pas de CMHII et ne sont donc pas des CPA. On retrouve les FDC dans les OLII et plus précisément dans les follicule primaires et secondaires où leurs dendrites forment un réseau pour supporter la prolifération des LB. Les FDC possèdent à leur surface des FcR qui leur permettent d'opsoniser des complexes anticorps-antigène. Les FDC peuvent également acquérir des antigènes transportés par les LB d'une manière dépendante du complément. Les antigènes peuvent être conservés sous leur forme native par les FDC

pendant de longues périodes stockés dans des vésicules endosomales pour les protéger pour être présentés aux LB (Heesters et al., 2014; Plaforet, 2013).

Cette reconnaissance de l'antigène sous forme native par le BCR initie la deuxième étape de maturation du LB qui est alors activé. Après avoir rencontré son antigène spécifique, le LB capture l'antigène par internalisation du complexe immun. Le LB migre alors à l'interface de la zone T et de la zone B pour interagir avec des cellules pré-TFH de même spécificité antigénique et exercer une fonction de CPA vis-à-vis des LT. L'antigène capturé peut également parvenir par drainage passif par la lymphe, peut être capturé à la surface des DC ou encore présenté par les macrophages sous capsulaires sous forme de complexes immuns (Qi et al., 2006; Rozendaal et al., 2009).

De même que pour les LT et leur TCR, les LB portent un grand nombre de copies d'un unique **BCR** qui leur est propre. Cette diversité est possible par le processus de recombinaison génétique précédemment expliqué. Rapidement, la chaîne légère du BCR est formée en associant les uns aux autres un des segments variables V parmi la quarantaine existante, un des 6 segments jonctions J parmi la trentaine existante aux segments communs C. La chaîne lourde du BCR est formée en associant un des segments variables V, un des segments jonctions J aux segments communs C mais également un des segments de diversité D parmi la trentaine. Les possibilités de recombinaison sont donc très importantes, de l'ordre de 10^{13} . De même que pour les TCR, les recombinaisons sont effectuées par un complexe enzymatique à l'aide de séquences RSS présentes de part et d'autre des segments de gènes V, D et J codant pour les chaînes lourdes puis légères du BCR (Chien et al., 1984). La réaction est initiée par les deux enzymes indispensables RAG-1 et RAG-2 (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

Les LB activés peuvent se différencier soit en LB mémoire soit en plasmocytes, les cellules effectrices de la réponse humorale qui sont les seules à sécréter les anticorps.

3.4. La réaction du centre germinatif des OLII

En absence de pathogène, les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions et rate contiennent des follicules primaires composés de LB naïfs. Cinq à sept jours après infection primaire ou une première immunisation, la réponse adaptative, spécifiquement dirigée contre les antigènes du pathogène ou du vaccin, se met en place. Pour augmenter la taille du répertoire des antigènes reconnus, peu de lymphocytes sont spécifiques d'un même

antigène. Après rencontre avec leur antigène spécifique, les lymphocytes s'activent et se mettent à proliférer.

3.4.1. Phase extra-folliculaire et formation du CG

Après avoir reconnu leur antigène spécifique par leur BCR, les LB vont présenter des peptides antigéniques par leur CMH II aux LT de même spécificité qu'eux préalablement différenciés en Tfh. Pour que cette première rencontre ait lieu, les LB et les LT CD4+ doivent migrer et se relocalisent vers la bordure T-B. D'une part les chimiokines **CCL21 et CCL19** présentes dans la zone T permettent la migration des LB qui expriment leur récepteur **CCR7**. D'autre part, la chimiokine **CXCL13**, constitutivement exprimée par les FDC présentes dans la zone B, permet la migration des LT qui expriment son récepteur **CXCR5**. Pour maintenir une synapse immunologique stable entre le Tfh et le LB pour l'initiation du GC, l'affinité de ces cellules pour l'antigène est importante de même que l'expression de molécules d'adhésion telles que **SAP** (Cannons et al., 2006, 2010). Par la suite, grâce à Ascl-2, les LB et les Tfh diminuent l'expression de **CCR7** qui, combinée à leur forte expression de **CXCR5** leur permet de migrer au centre du follicule en réponse au **CXCL13** sécrété dans le follicule B (Reif et al., 2002).

Les LB et les Tfh activés s'accumulent et forment un nouveau CG (Vinuesa and Cyster, 2011). Sept jours après l'exposition de l'organisme à l'antigène, le centre germinatif est complètement formé et s'organise en deux zones caractérisées par leur composition cellulaire et leur fonction.

3.4.2. Centre Germinatif

La différenciation terminale des Tfh conduit à la formation d'un follicule secondaire : le CG, une structure transitoire. Il est composé principalement de LB activés qui se déplacent constamment et rapidement entre la zone claire et la zone sombre, ne s'arrêtant que brièvement pour se diviser et interagir avec les Tfh et les FDC présentatrices de l'antigène qui le composent également (Allen et al., 2007; Bannard et al., 2013). Ils sont le site de la sélection clonales des LB, de leur expansion clonale, de la maturation par Hyper Mutation Somatique (HMS) des séquences germinales VDJ, par commutation de classe ainsi que de sélection par affinité des LB (Berek et al., 1991; Victora and Nussenzweig, 2012; Victora et al., 2010). De cette manière ils assurent la production d'Ig spécifiques et dont l'affinité pour l'antigène croît avec le temps pour une réponse humorale efficace et durable contre

l'invasion des pathogènes (Suan et al., 2017a) lorsque les LB se différencient en LB mémoire ou en plasmocytes à longue durée de vie et sortent du GC pour retourner dans la circulation.

Les CG sont spatialement séparés en deux zones. La zone claire est le site de sélection par les FDC et les LB reçoivent des Tfh des signaux indispensables à leur prolifération et à leur survie. Ces LB migrent ensuite dans la zone sombre, site de l'expansion clonale, des commutations isotypiques et de l'HMS des BCR.

3.4.3. Zone claire : interaction LB-Tfh et sélection clonale

La première zone, la zone claire, est composée d'un réseau de FDC qui présentent l'antigène (Mandel et al., 1980), de Tfh qui apportent leur aide pour la sélection des LB les plus affins pour l'antigène et de LB activés appelés **centrocytes**. Les LB du CG luttent pour l'aide limitée des lymphocytes Tfh. En effet, la succession de contacts de très courte durée entre les Tfh et les LB permet une forte compétition entre les LB pour obtenir l'aide des Tfh et les FDC sélectionnent les LB de haute affinité pour l'antigène. L'interaction des FDC avec les LB de plus haute affinité bloque les mécanismes d'apoptose subis par les LB non liés aux FDC à cause de leur plus faible affinité. Les LB sélectionnés peuvent alors repartir pour un cycle de maturation (Aguzzi et al., 2014; Allen et al., 2007).

L'interaction antigène spécifique avec les LB dépend de l'engagement **d'ICOS** et d'autres molécules de co-stimulation (CD40-CD40L) ainsi que différentes cytokines (IL-21, IL-10 et IL-4). Des molécules d'adhésion (SAP) permettent le maintien de l'expression de Bcl-6 par les pré-CG TFH et l'acquisition de caractéristiques phénotypiques spécifiques des effecteurs Tfh dans les CG tel que vu précédemment.

Les Tfh présents au sein des GC (GC-Tfh) expriment des niveaux plus élevés de CXCR5, PD-1 et Bcl-6 (CD4+ CXCR5hi PD-1hi Bcl-6hi) ce qui permet de les différencier des pré-Tfh CD4+ CXCR5+ PD-1+ Bcl-6+. **PD-1** est fortement exprimé à la surface des Tfh du CG suite à une stimulation antigénique chronique du TCR par les LB (Wang et al., 2011). Les Tfr (CXCR5+ Bcl6+ FoxP3+) limitent la différenciation et la fonction des Tfh ce qui leur confère une capacité à contrôler la réponse humorale (Linterman et al., 2011). L'engagement de PD-1 par son ligand PDL-1 diminue le nombre de TFR et contrôle donc l'inhibition des Tfh par les Tfr (Chung et al., 2011b).

D'une part, il a été montré que l'engagement de **CD40L** avec **CD40** entre les LB et les Tfh au stade précoce est nécessaire pour l'expansion clonale des LT et le développement des CG

(Grewal et al., 1995). D'autre part, l'analyse du transcriptome des LB des CG montre une expression de gènes pro-apoptotiques. La régulation des signaux de survie est donc indispensable pour assurer le maintien des LB du CG. L'engagement CD40L/CD40 induirait l'augmentation de l'expression de **Bclx** (anti-apoptotique) et rend résistant à **Fas/FasL** (pro-apoptotique) (Zhang et al., 1996). **L'IL-21** soutient également la survie des LB du CG de même que **SAP**, surexprimé au sein des Tfh et impliqué dans les mécanismes moléculaires conduisant à la production d'**IL-4** (Yusuf et al., 2010).

3.4.4. Zone sombre : maturation des LB

Les GC-Tfh interagissent avec les GC-LB pour faciliter la maturation et la commutation de classe des immunoglobulines (Fazilleau et al., 2009b) et aboutir à l'établissement d'une réponse humorale composée de cellules effectrices et mémoires. Après interaction avec les Tfh, les LB migrent dans la seconde zone des CG, la zone sombre où ils sont en prolifération et sont alors appelés **centroblastes**.

L'**HMS** est un processus de diversification du répertoire des LB au cours duquel des mutations ponctuelles et aléatoires sont introduites dans les gènes codant l'Ig et plus particulièrement les régions variables des chaînes lourdes et légères (MacLennan, 1994). Les mutations délétères vont raccourcir les régions variables permettant la reconnaissance de l'antigène. Au contraire, les mutations d'insertion augmentent la longueur des régions variables. D'autres mutations de substitution participent également à la diversification des BCR, permettant l'apparition de BCR plus affins pour l'antigène qui sont préférentiellement sélectionnés dans la zone claire (Victora and Nussenzweig, 2012; Victora et al., 2010).

La **commutation de classe** se produit uniquement après engagement du CD40 du LB pré-activé avec son ligand CD40L du pré-TFH de même spécificité antigénique (McHeyzer-Williams et al., 2015a). Ce processus de modification de la séquence codant pour la région Fc du BCR transforme une Ig d'isotype IgM en un autre isotype tout en conservant sa spécificité antigénique contrairement à l'HMS. Les cytokines libérées par les Tfh dans le micro-environnement orientent la commutation vers un isotype donné en fonction du besoin fonctionnel (Stavnezer et al., 2008). Les IgM et IgD initialement présents à la surface des LB deviennent ainsi des isotypes dit « secondaires ». Par exemple, l'IL-4 induit une commutation en IgE et IgG1 qui sont ensuite sécrétés par les cellules plasmatisques. De plus un déficit d'IL-21 affecte profondément la maturation d'affinité et diminue le nombre de LB IgG1+ dû à un manque d'expression de Bcl-6 (Avery et al., 2008).

Les LB doivent être capable reconnaître leur antigène et aussi d'apprêter et de présenter l'antigène pour être positivement sélectionnés, survivre, proliférer et se différencier en cellules plasmatiques à la suite de ces étapes de maturation. Après modification de leur affinité pour l'antigène, les LB arrêtent de proliférer et redeviennent des **centrocytes**.

3.5. Mémoire

3.5.1. Devenir des LT

Après avoir aidé les LB à maturer pour la production d'anticorps efficace, les TFH effecteurs peuvent se différencier en TFH mémoires. En cas de re-stimulation antigénique, ces Tfh mémoires conservent la capacité de se différencier rapidement en Tfh effecteurs (Liu et al., 2012).

Les Tfh mémoires sont une population hétérogène avec des phénotypes et des fonctions différents. Le phénotype de ces populations est difficile à déterminer, c'est en partie pourquoi les Tfh mémoires sont classifiés selon leur localisation spécifique et leur fonction. Les Tfh mémoires peuvent ainsi divisés en deux grandes sous-populations : les Tfh mémoires locaux localisés dans les follicules B à proximité des LB mémoires OLII et les Tfh mémoires circulants retrouvés en dehors des OLII, notamment dans la circulation sanguine. Les Tfh mémoires locaux ont un TCR de haute affinité avec des niveaux d'expression plus élevés de Bcl-6, CXCR5, ICOS et PD-1 qui les rapprochent des Tfh effecteurs par rapport aux Tfh mémoires circulants qui ont un phénotype CD62LhiCCR7+ leur permettant de recirculer. De plus, les Tfh mémoires locaux expriment principalement le phénotype CD62LloCCR7- qui ressemble au phénotype des LT effecteurs mémoires alors que leur localisation dans les OLII correspond à celle associée aux LT mémoire centraux (Asrir et al., 2017). Cette population mémoire a été identifiée comme persistante au niveau des GLD jusqu'à 200 jours, probablement grâce à une exposition prolongée à l'antigène, avec une expression de CXCR5, ICOS et OX40 diminuée (Fazilleau et al., 2007). Concernant leurs rôles, les Tfh mémoires locaux favorisent la différenciation des LB en plasmocytes, tandis que les Tfh mémoires circulants sécrètent plus d'IFN- γ et d'IL-21 et sont donc plus enclins à rediriger les LB vers les CG (Asrir et al., 2017).

La présence des Tfh mémoires circulants est par ailleurs corrélée avec une réponse anticorps protectrice dans la vaccination contre la grippe ou la génération d'AcN dirigés contre le VIH (Locci et al., 2013).

Dès le début de la phase aigüe de l'infection VIH, les Tfh résidents dans les OLII sont la cible du VIH et constituent un compartiment majeur pour la réPLICATION et la production de particules virales. Dans le sang, les Tfh mémoires circulants au servent de réservoir au VIH chez les personnes une fois l'infection devenue chronique. De plus, l'infection VIH affecte gravement la fréquence et les fonctions des Tfh nécessaires pour l'induction d'une réponse humorale protectrice. Ces observations pourraient expliquer les difficultés rencontrées par le système immunitaire à induire une protection efficace contre le VIH et pourquoi seulement moins de 1% des patients infectés par le VIH développent des AcN à large spectre (Graff-Dubois et al., 2016).

3.5.2. Devenir des LB

La réponse humorale repose sur la production d'Ig solubles dirigés contre des pathogènes pour les éliminer. Après activation par reconnaissance de son antigène spécifique, un LB peut soit se différencier directement en cellule productrice d'anticorps soit maturer puis se différencier en cellule mémoire productrice ou non d'anticorps. Les plasmocytes sont les seules cellules capables de produire des anticorps, des Ig sous forme solubles monomériques (IgD, IgG, IgE, IgA1) ou multimériques (IgA2, IgM).

Plasmocytes à courte durée de vie

Lors d'une réponse humorale primaire, après la phase extra-folliculaire, une partie des LB se différencie précocement en plasmablastes à courte durée de vie pour répondre rapidement à l'infection. Suite à l'interaction CD40L-CD40 avec les Tfh, ces cellules prolifèrent et maturesnt en plasmocytes pour sécréter rapidement des IgM, caractéristique d'une réponse au premier contact avec l'antigène, mais de faible affinité. Ces IgM sont par la suite remplacés dans l'organisme par la production d'autres isotypes plus matures tels que les IgG, IgA ou IgE de plus forte affinité (Pieper et al., 2013).

Réponse mémoire

Les réponses mémoires sont primordiales pour une bonne défense de l'organisme contre les agents infectieux. Avec les réponses spécifiques, les réponses mémoires sont les caractéristiques propres aux réponses immunitaires adaptatives. A partir de la deuxième rencontre avec un pathogène, on parle de réponse secondaire. Cette réponse secondaire met en jeux les cellules mémoires dont les LB mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie générés par les précédentes infections. Ces cellules permettent de défendre plus rapidement et plus efficacement l'organisme contre des pathogènes rencontrés auparavant.

La fonction principale des CG est de produire les LB mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie de haute affinité (Cannons et al., 2010). Les LB mémoires sont retrouvés dans les OLII tandis que les plasmocytes à longue durée se nichent dans la MO.

Les [plasmocytes à longue durée de vie](#) sont les premières cellules de la réponse mémoire à intervenir dans la réponse secondaire. Les Ig qu'elles sécrètent en continu sont la première ligne de défense de la réponse humorale secondaire. Ils permettent de ralentir l'infection précocement avant que les LB mémoires prennent le relais si les anticorps spécifiques des antigènes de l'agent infectieux ne parviennent pas à contenir l'infection. On parle de mémoire humorale constitutive. Comme nous venons de le voir, la réaction du CG permet aux LB de maturer et d'augmenter considérablement l'affinité de leurs anticorps. La liaison de l'IL-21 à son récepteur induit des signaux spécifiques pour la différenciation en plasmocytes à longue durée de vie au sein des LB sortant de cette réaction par la voie de signalisation STAT3-Blimp-1. Les phénomènes de maturation du LB sont importants car non seulement la quantité d'anticorps spécifiques est importante pour contrôler une infection, mais également la qualité de ces anticorps. Dans notre cas, ces anticorps doivent être capables de neutraliser l'infection des cellules cibles par la souche du VIH responsable de l'infection mais également par les futurs variants d'autres souches de ce virus qui mute sans cesse.

De même que pour les Tfh mémoires, les [LB mémoires](#) sont une population très hétérogène de par la classe d'Ig, l'affinité de leur BCR, les marqueurs exprimés ou leur localisation.

Les LB mémoires sont réactivés rapidement par liaison du CD28 lors d'une réponse secondaire contre un pathogène pour lequel ils sont spécifiques. Ils suppléent les plasmocytes à longue durée de vie pour la production d'anticorps si la réponse constitutive est insuffisante pour limiter l'infection. Les LB mémoires IgM+ et IgG+ activés exercent des fonctions différentes après réinfection. Les LB mémoire IgG+ ont plutôt tendance à se différencier préférentiellement en plasmoblastes pour directement produire des anticorps, tandis que les LB mémoires IgM+ prolifèrent et entrent dans la réaction du CG pour maturer (Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011).

Les LB mémoires vont présenter l'antigène associé au CMH II aux Tfh mémoires de même spécificité antigénique et rapidement induire l'augmentation du niveau de Bcl-6 des Tfh mémoires proches d'eux dans les follicules B et ainsi les activer. Ces Tfh effecteurs

secondaires ont une efficacité supérieure aux Tfh effecteurs primaires (expriment des niveaux plus élevés PD-1, Bcl-6, CXCR5, et d'IL-21). Ainsi, la commutation de classe est accélérée et la réponse B conduit à l'augmentation du titre d'anticorps spécifiques. La proximité entre TFH mémoires et LB mémoires de même spécificité antigénique est donc importante pour une réponse anticorps secondaire rapide et efficace. On parle alors dans ce cas de mémoire réactive avec une production d'anticorps plus importante et de plus forte affinité que la réponse primaire (Ahmed and Gray, 1996).

Aucun marqueur spécifique n'ayant été décrit, plusieurs marqueurs sont nécessaires pour identifier les LB mémoires, bien souvent après avoir éliminé la possibilité des populations de LB naïfs (IgD+) ou de LB CG (GL7+ CXCR5+) (Allie and Randall, 2020). Chez la souris, le CD38 est un marqueur exprimé par les LB naïfs et les LB mémoires. Les LB naïfs diminuent l'expression de ce marqueur en se différenciant en LB du CG ou en plasmocyte. Par la suite, les LB restaure l'expression de CD38 lors de leur différenciation en LB mémoires (Allie and Randall, 2020; Schroeder et al., 2019). D'autres marqueurs doivent être utilisés pour distinguer les LB chez l'homme. Les LB mémoires conventionnels expriment CD27, cependant ce marqueur n'est pas exprimé sur les LB mémoires murins (Tarlinton and Good-Jacobson, 2013).

On peut classer les LB mémoires en sous populations selon leur localisation entre les LB mémoire locaux que l'on trouve dans les OLII et qui expriment des Ig isotypiques de haute affinité (autres que IgM) et les LB mémoires circulants principalement IgM+ de faible affinité. Outre leur localisation, pour les identifier on peut utiliser des marqueurs liés à cette localisation. La plupart des LB mémoire résidentes dans les tissus diminuent leur expression de CCR7 et CD62L limitant ainsi leur capacité à traverser les HEV, les empêchant de recirculer dans les OLII. D'autres LB mémoires peuvent perdre l'expression de CXCR5 qui permet leur maintien dans les follicules des OLII (Allie and Randall, 2020).

De plus, en fonction des conditions pathologiques ou non, on ne retrouve pas les mêmes sous-populations de LB mémoires. Il a été mis en évidence plusieurs sous-populations de LB mémoire circulants dans l'infection VIH par exemple, en plus des LB mémoires conventionnels (dit « au repos ») qui expriment CD21, la présence de LB mémoires non conventionnels qui expriment peu CD21. Ces LB mémoires non conventionnels sont divisées entre les LB mémoires activés et des LB mémoires associés au tissu. Les LB mémoires activés expriment des marqueurs d'activation et des marqueurs associés à l'apoptose tandis que les

LB mémoires associés au tissu n'expriment pas CD27 mais expriment fortement CD20, CXCR3 et CD11c. Ces LB mémoires associés au tissu possèdent plusieurs caractéristiques similaires aux LB sénescents en l'absence de tout processus pathologique spécifique. (Moir and Fauci, 2017).

Hypothèses et Objectifs

La vaccination prophylactique a pour objectif d'enclencher la réponse adaptative primaire par immunisation contre un ou plusieurs antigènes du pathogène ciblé. La formulation vaccinale s'avère essentielle pour orienter et moduler la réponse innée qui orientera par la suite la réponse adaptative en induisant des T_{FH} et des LB du CG afin d'obtenir des AcN protégeant l'individu vacciné contre le VIH par exemple (Wang et al., 2016).

Notre hypothèse de travail est la suivante : la nature de l'adjuvant utilisé dans la formulation du candidat vaccin déterminerait l'amplitude des réponses innées et adaptatives ainsi que leur qualité, notamment, l'induction des anticorps neutralisants. La stratégie de vaccination adoptée impacterait la maturation et la différenciation des cellules impliquées dans la réponse adaptative et le mécanisme d'induction des anticorps neutralisants dépendrait de la qualité de l'induction des cellules Tfh et des LB du CG. Quant à la réponse innée initiée suite à l'immunisation, elle serait responsable de la qualité de l'activation et de la maturation des lymphocytes.

L'objectif premier de mon travail de thèse a donc été de déterminer la formulation (adjuvant) du candidat vaccin W614A-3S couplé à une protéine conjuguée pour l'induction d'AcN capable de neutraliser *in vitro* plusieurs souches de VIH, prérequis pour une étude clinique chez l'homme. Les anticorps induits dans deux modèles précliniques, chez la souris et le lapin, seront quantifiés par ELISA et leur séquence sera étudiée.

Une fois ces conditions déterminées nous avons utilisé ce modèle afin d'étudier les événements cellulaires lors des réponses adaptatives et des réponses innées impliquées dans l'induction des AcN. La cytométrie en flux permettra de quantifier et qualifier différentes populations cellulaires dans les GLD et le muscle après immunisation. La qualité des LB des GLD sera étudiée plus en détails par quantification de l'expression génique par RT-PCR à l'échelle unicellulaire.

Résultats

1. Réponse adaptative : article

La vaccination VIH-1 est un enjeu sanitaire planétaire. Depuis l'apparition du VIH-1 dans les années 1980, aucun vaccin n'a su prévenir de l'infection par les nombreuses souches de VIH-1. Le VIH-1 possède plusieurs mécanismes d'échappement au contrôle du système immunitaire tels que son fort taux de mutation ou sa capacité de recombinaison. Des traitements antirétroviraux sont disponibles à l'heure actuelle pour maintenir une charge virale à un niveau indétectable. Cependant l'arrêt de ces traitements entraîne un rebond viral. Ces traitements, bien qu'ils permettent aux personnes infectées d'allonger leur espérance de vie, n'affecte pas le réservoir viral et ne permettent en aucun cas de guérir de l'infection. La protection contre l'infection par la vaccination est donc un enjeu prioritaires et un vaccin prophylactique induisant des anticorps capables de neutraliser un maximum de souches de VIH, et ainsi prémunir d'une infection, est donc urgentement nécessaire.

Le premier objectif de cette thèse est donc de déterminer une formulation du candidat vaccin W614A-3S-CRM capable d'induire une réponse neutralisante contre le VIH-1 avec un spectre le plus large possible. En effet, le vaccin W614A-3S-CRM formulé avec l'IFA a montré sa capacité à induire des anticorps de type neutralisant contre différentes souches de VIH-1 dans le modèle lapin et murin. Cependant cet adjuvant est inutilisable chez l'homme de par ses effets secondaires trop importants. Il a donc été nécessaire de déterminer une formulation pour ce candidat vaccin qui soit compatible avec une utilisation chez l'homme, l'objectif final étant de tester ce vaccin lors d'essais cliniques. Pour cela, le candidat vaccin W614A-3S-CRM a été testé dans un modèle de lapin et murin avec deux adjuvant bien connus et licenciés pour une utilisation chez l'homme : l'hydroxyde d'aluminium ou Alum et une émulsion à base de squalène proche du MF-59 : Squalene ou SQE.

Les deux formulations vaccinales permettent l'induction d'Ac spécifique contre le peptide W614A-3S. Pour déterminer les capacités de neutralisation de différentes souches du VIH de ces anticorps, le sérum de lapins immunisés a d'abord été purifié pour obtenir les IgG spécifiques du peptide W614A-3S. Ensuite, un panel de différentes souches connues pour être plus (tiers 1) ou moins (tiers 2) faciles à neutraliser, comprenant des souches de référence décrites par l'équipe de Montefiori (deCamp et al., 2014a) comme représentatif

de l'épidémie mondiale. Ces tests de neutralisations *in vitro* montrent que les IgG spécifiques obtenus après immunisation avec l'Alum sont incapables de neutraliser les souches de VIH-1 tiers 1 et tiers 2 testées. Au contraire, la formulation Squalene permet l'induction d'anticorps capables de neutraliser en moyenne 85% des souches du panel testé.

Suite à ces observations, notre deuxième objectif est de comprendre les mécanismes immunitaires qui diffèrent entre l'induction de la production d'anticorps neutralisants et de la production d'anticorps non neutralisants. En effet, les résultats obtenus avec les adjuvants Squalene et Alum ont permis d'observer une dichotomie entre l'induction d'anticorps neutralisants ou non dirigés contre le même peptide et donc de définir un très bon modèle d'étude de la réponse neutralisante. Pour disséquer le processus d'induction d'anticorps neutralisants, le modèle d'immunisation avec le vaccin candidat W614A-3S-KLH formulé en Alum ou en Squalene a été transposé chez la souris.

En première approche, nous avons étudié la réponse humorale et plus particulièrement les LB spécifiques présents dans les ganglions drainants impliqués dans la réponse neutralisante. Le dosage des IgG spécifiques par ELISA et la quantification des LB spécifiques dans les ganglions drainants par cytométrie en flux ne montre aucune différence quantitative significative après immunisation entre les formulations Alum et Squalene du vaccin candidat. Se pose alors la question de la qualité des LB spécifiques induits par la formulation du vaccin candidat. La quantification par RT-PCR de l'expression de gènes dans les LB spécifiques du ganglion drainant à l'échelle unicellulaire permet l'identification de plusieurs populations cellulaires dont les LB CG (Bcl-6hi) ainsi que des précurseurs des plasmocytes (CD69hi). En outre le nombre de LB CG augmente plus fortement après la deuxième immunisation formulée en Squalene en comparaison de la formulation Alum. Au contraire, la population de précurseurs des plasmocytes est principalement observée après la troisième immunisation formulée en Alum en comparaison de la formulation Squalene. Les profils d'expression génique sont donc différents entre les LB spécifiques du peptide W614A-3S induits par la formulation Alum et Squalene suggérant des différences dans la maturation de ces cellules selon la formulation du candidat vaccin. La diversité du répertoire représenté par la diversité des séquences VDJ ne permet pas de déceler de séquence commune entre les LB spécifiques dans les ganglions drainants après la dernière immunisation formulée en Squalene ou en Alum ce qui renforce cette notion de dichotomie. De plus, bien que la longueur de CDR3 semble jouer un rôle dans la capacité des anticorps à neutraliser le

pathogène, les longueurs des CDR3 après la dernière immunisation formulée en Squalene ou en Alum semblent comparables.

Pour conclure, la formulation du vaccin candidat W614A-3S-CRM avec de l'Alum ou du Squalene impacte la quantité et la qualité des LB du CG après immunisation. Ces différences se traduisent par l'induction de réponses anticorps non-neutralisants pour la formulation Alum contre la production d'anticorps neutralisants avec la formulation Squalene. Ces anticorps neutralisants sont capables de neutraliser un large éventail de souches de VIH-1 hétérologues et de tiers 2.

Titer : Squalene emulsion adjuvant is more effective than Alum at prompting broadly neutralizing antibodies in response to HIV-1-peptide-conjugated vaccine

Olivia Bonduelle¹, Chloé Chaudesaigues¹, Monica Tolazzi², Ehsan Suleiman³, Simon de Bernard⁴, Julien Nourikyan⁴, Mylene Bohec⁵, Laura Baudrin⁵, Dietmar Katinger³, Patrice Debré¹, Gabriella Scarlatti², Vincent Vieillard¹, Behazine Combadière¹.

¹ Sorbonne Université, Inserm U1135, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses – Cimi-Paris, F-75013, Paris, France.

² Viral Evolution and Transmission Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy.

³ Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH, Klosterneuburg, Austria.

⁴ Altrabio, Lyon, France.

⁵ Genomics of Excellence (ICGex) Platform, Institut Curie Research Center, Paris, France.

Corresponding author : Dr Behazine Combadière, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses Cimi-Paris, Faculté de Médecine Sorbonne Université, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Phone: +33140779888, E-mail: behazine.combadiere@sorbonne-universite.fr

Running title: Novel HIV-peptide-conjugate vaccine for bNAbs induction

Keywords: neutralizing antibodies, HIV, adjuvant, B cells, germinal center

Abbreviations:

Alum: Aluminium hydroxide; bNAb: Broadly Neutralizing Antibody; GC: Germinal Center;

NGC: Non-Germinal Center, SQE: Squalene emulsion.

Funding

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant. Behazine Combadière's laboratory has received funding from the Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM 2020" award.

High-throughput sequencing has been performed by the ICGex NGS platform of the Institut Curie supported by the grants ANR-10-EQPX-03 (Equipex) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium) from the Agence Nationale de la Recherche ("Investissements d'Avenir" program), by the Canceropole Ile-de-France and by the SiRIC-Curie program - SiRIC Grant "INCa-DGOS-4654".

Abstract

Background: Preventive vaccines able to induce broadly neutralizing antibodies (bNAbs) are needed against HIV. Our strategy is based on 3S motif of the gp41, namely W614A-3S following the observation of natural anti-W614A-3S NAb which can be detected in long-term non-progressor HIV⁺ patients and thus could be a potential novel vaccine candidate.

Objective: We compared the efficacy of two vaccine formulations in squalene emulsion (SQE) and Aluminium hydroxide (Alum) in the induction of broadly NAb against HIV strains in preclinical models. We sought to bring insight into mechanism of B cell maturation following vaccination using these two formulations.

Methods: Rabbit and mouse models were used to screen the induction of bNAbs following 4 immunizations using W614A-3S vaccine formulated in SQE and Alum. W614A-3S-specific B cells were isolated from mice for single-cell gene expression by qRT-PCR and single-cell V(D)J sequencing.

Finding: Both preclinical models showed that SQE adjuvant was more efficient than Alum at prompting W614A-3S-specific bNAbs with a breath of 67-93% viral neutralization. We showed that germinal center B cells were more frequent in SQE compared to Alum condition however with differential gene expression profile. These results suggest both qualitative and quantitative difference in B cell maturation and proliferation with these two formulations. The single-cell V(D)J sequencing of W614A-3S-specific BCR showed significant differences in BCR sequences and validated the dichotomy between SQE and Alum formulation.

Conclusion: Adjuvant formulations of our novel vaccine candidate W614A-3S impact the quantity and quality of B cells immune responses both at gene expression level and BCR sequences.

Introduction

The HIV disease remains a major public health. There is no cure for HIV infection, but an effective antiretroviral therapy allowing to control the virus and help to prevent transmission. In fact, this virus poses challenges for vaccine development. Over time, the virus evolved a number of evasion mechanisms, through particularly Env protein, by extensive amino acid variations, and a conformational instability. HIV-1 Env is the only target of antiviral antibodies (Mascola and Montefiori, 2010). Ten to 30% of HIV⁺ patients have serum antibody capable to neutralize the virus infection of cells, and some could neutralize a majority of different cross-clade viral strains (Pilgrim et al., 1997). The first challenge is to design an immunogen that neutralizes virus entry against large multi-clade panels of genetically diverse HIV-1 Env-pseudotyped viruses maximizing potential clinical benefit. However, Env has evolved a number of immune evasion strategies that create a major hurdle for vaccine design, particularly extensive amino acid variation, structural and conformational instability, and immunodominance of hypervariable regions (Falkowska et al., 2014; Klasse et al., 2018b). The HIV-1 Env is a heavily glycosylated trimeric protein composed of three identical surface gp120 molecules, each noncovalently associated with a transmembrane gp41 molecule (Falkowska et al., 2014). The gp41 molecule is involved in the final steps of viral envelope fusion to the host cell membrane (Zolla-Pazner, 2004) and has been proposed in vaccination strategies.

We previously described a motif of HIV-1 gp41 named 3S “NH2-SWSNKS-COOH” (613-618 residue position) specific, conserved and absent in HIV-2 and SIV (Vieillard et al., 2005b).

We also previously demonstrated that a single amino-acid mutated form of the 3S motif in position W614 into Alanine (namely W614A-3S) increased its immunogenicity in preclinical models. Animal models including mice, rabbits and macaques showed immunogenicity of

W614A-3S peptide when coupled with Cross-Reacting Material 197 (CRM197) carrier and adjuvanted in incomplete Freund adjuvant (IFA), a water-in-oil emulsion (Petitdemange et al., 2013b). Importantly, natural Abs against the W614A-3S eluted from the plasma of HIV-1 patients showed neutralizing activity and were detected exclusively in patients with high CD4 counts and undetectable viral loads (<20 copies/mL) (Petitdemange et al., 2013b). These specific Abs were immunoglobulin G isotypes (data not shown). Natural NAbs directed against W614A-3S peptide can be detected in <5% of HIV⁺ patients, as compared to more than 50 % in 12 years long-term non-progressors (Lucar et al., 2017).

Translation into human clinical planned in Q3 2021 required validation in preclinical mouse and rabbit studies of vaccine formulations. Here, we aimed to test W614A-3S conjugated with a carrier protein and formulated either in Squalene emulsion (SQE) or Aluminum hydroxide (Alum) to induce neutralizing antibodies with large breadth against HIV-1 strains using both mice and rabbit preclinical models. We sought to bring insight into mechanism of B cell maturation by using single-cell gene expression. We demonstrated the dichotomy between SQE-based adjuvant and Alum in the induction of germinal center (GC) leading to bNAbs versus non-NAbs, respectively. Single-B cell analyses validated this dichotomy showing the differential gene expression as well as BCR sequences of W614A-3S-specific B cells generated in SQE compared to Alum formulation.

Results

Squalene emulsion adjuvant is more effective than Alum at prompting broadly neutralizing antibodies in response to W614A-3S peptide -conjugated vaccine

To evaluate the efficacy of W614A-3S-CRM197 conjugated vaccine formulated in SQE and Alum, in the induction of bNAbs, rabbits were immunized intramuscularly at week 0 (W0), W2, W4 and W10 to boost humoral response in 2 independent experiments (n= 4-5) (**Figure 101**

1A). W614A-3S-specific Abs were detected in all rabbits whatever the formulation (**Figure 1B**). We then assessed for neutralization activities against a panel of Tier 1 and Tier 2 viruses by TZM-bl neutralization assay platforms using whole serum at W20 (2 independent experiments n=2-5). Only W614A-3S- CRM197 immunization using SQE formulation showed neutralizing Abs however remained variable among rabbits. The antibody neutralization breadth varies between 25 and 69% of virus strains tested among rabbits (**Supplementary Figure 1**). Therefore, purified W614A-3S-specific rabbit IgG were tested in the TZM-bl neutralization assay. Out of a panel of 15 major HIV virus strain tested, SQE formulation induced W614A-3S-specific rabbit IgG that neutralized 67 to 93% of virus strains (**Figure 1C**). The majority of rabbit purified Abs neutralized the 5 virus strains of Montefiori global panel used to standardized assessments of NAb efficacy (deCamp et al., 2014b).

In order to further progress in the immune mechanism of induction of NAbs versus non-Nabs using these two formulations, we validated our vaccine strategy, by using W614A-3S peptide coupled with either the KLH or CRM197 with SQE or Alum formulation. Immunization protocol was shown in **Figure 2A**. W614A-3S-specific IgG were detected in all mice immunized with W614A-3S peptide coupled with either CRM197 or KLH and formulated in SQE or Alum (data not shown). We pooled 5 sera of same group mice prior W614A-3S-specific IgG purification. We confirmed the detection of the neutralization of two Tier 2 virus (JR-CSF and YU2) by W614A-3S-specifc Abs following W614A-3S-CRM197 (**Supplementary Figure 2**) or W614A-3S-KLH immunization (**Figure 2B**). This result was obtained only after formulation with SQE emulsion and not when vaccine was formulated in Alum.

In order to further study B cell differentiation and maturation, we measured W614A-3S-specific B cells in draining lymph nodes (dLNs), using W614A-3S-biotinylated Ovalbumine (Ova). Flow cytometry analysis of W614A-3S-biotinylated Ova staining of B cells in either PBS or W614A-3S formulated in SQE or Alum were shown in Figure 2C. Despite

background staining in control PBS injected mice, we were able to discriminate the W614A-3S-specific B cells over time in mice following both SQE or Alum formulation (**Figure 2C and 2D**). No significative difference between SQE and Alum conditions was observed at W3 and W5 in the absolute numbers of W614A-3S-specific B cells (**Figure 2D**).

Thus, both formulations induced W614A-3S- specific B cells and W614A-3S-specific IgG responses. However, we found that SQE formulation of our vaccine candidate, W614A-3S-conjugated with a carrier protein, induced bNAbs when neutralizing activity was nonexistent following vaccination using Alum formulation. These data have been used in Go/noGo criteria for a phase I clinical study that will start in September 2021. Here, we propose to bring insight into the mechanism of B cell immune responses.

Differential gene expression in W614A-3 -specific B cell populations following W614A-3S-KLH vaccination using SQE and Alum formulations

We used single-cell quantitative RT-PCR approach to compare the quality of W614A-3S-specific B cell populations isolated from dLNs, one week after 2nd and 3rd immunizations (W3 and W5 respectively; **Figure 2C**) between the two formulations.

We purified W614A-3S-specific B cell by cell sorting of 2 groups of 5 mice per condition. After quality control, we analyzed 73 detectable genes after data cleaning (M&M and **Supplemental Table 1**) in 747 antigen-specific B single-cells. We used dimensional UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) regression to compare B lymphocytes distribution in SQE and Alum immunization conditions (**Figure 3A**), at W3 (2nd injection) and W5 (3rd injection). Whereas no difference in B cell distribution was observed at W3, UMAP allowed to segregate B cells in SQE formulation compared to Alum formulation at W5 (3rd immunization), suggesting a differential gene expression of W614A-3S-specific B cells.

A FlowSOM Elbow Metaclustering of all 747 cells allowed us to identify 6 populations of antigen-specific B cells that are represented by different levels of gene expression (**Figure 3B**). One cluster representing few cells (38 of 747 cells) with a very low gene expression, was removed of the analyses. We identified Germinal Center (GC) B cells (expressing Bcl6, Fas, Efnb1 and Id3 genes), plasma cell precursors (high expressing Prdm1, Irf4, Cd69 and Myc genes). We also identified 3 different memory B-cell populations (high expressing Cd38, Sell and Itga4 genes) that are differentiated by 1) high expression of Ccr6, Il9r, Tlr7, Sox2 and Cd93 genes, 2) low expressing Rela and high expressing Il10ra, and 3) inversely high expressing Rela and low expressing Il10ra genes.

According to the literature, high expressing CCR6 B cells might be memory precursors in light zone of GCs with low antigen affinity (Suan et al., 2017b). GC B cells and plasma cell precursor populations were individualized compared to 3 memory B cells. The abundance of plasma cell precursors in Alum condition and the abundance of GC B cells in SQE condition were significant as shown in Volcano plot (p-value threshold <0.1; **Figure 3C**). Percent total number of cells (n=747) is represented in Figure 3D. We found that plasma cell precursors were present principally after 3rd immunization (W5) in Alum condition whereas the GC B cell abundance was higher in SQE conditions (**Figure 3D**), however, the proportions of 3 memory B-cells were similar between Alum and SQE formulations (**Figure 3D**).

These increase of GC B cell numbers after SQE immunization over time was validated by flow cytometry (**Figure 3E**). We observed significant higher numbers of W614A-3S-specific GC B cells after first and second injection (p=0.0495 and 0.0011 respectively) as detected by flow cytometry in SQE condition compared to Alum condition. When comparing single-cell analysis to flow cytometry, we found that both formulations induced GC B cells however their frequencies are significantly higher in SQE condition compared to Alum with similar gene expression profile at W3. Interestingly, at W5, gene expression of W614A-3S-specific B

cells were distinct in SQE condition compared to Alum suggesting qualitative differences in W614A-3S-specific B cells would occur between the 2nd and 3rd injection.

Significant diversity of B cell repertoire of Germinal Center and Non-Germinal Center B cells following W614A-3S-KLH vaccination using SQE and Alum formulations

To evaluate clonal diversity of W614A-3S-specific B cells using SQE and Alum formulations, we purified W614A-3S-specific B lymphocytes at W11, one week after fourth immunization when serum NAb detection was at detectable level with W614A-3S-specific B cells in sufficient number for the isolation. We purified W614A-3S-specific IgG1⁺ GC (GL7⁺IgD⁻) and non-GC (NGC; GL7⁻IgD⁺) B cells for single-cell V(D)J sequencing (Gating strategy is shown in **Figure 4A**). At W11, we did not find any significative difference in the absolute numbers of W614A-3S-specific IgG1⁺ GC and NGC B cells between SQE and Alum conditions (**Figure 3B**).

The amino acid analysis of the variable part of Heavy (H) and Light (L) IgG1 chain sequencies, the third complementarity-determining region (CDR3), were determined in both conditions and cell types with a total of 433 distinct sequencies, regardless of their frequencies in samples. Clonotypes with exactly one heavy and one light chain were considered in the analysis. Venn Diagram analysis showed the number of CDR3 sequences in each condition (SQE and Alum) and cell types (GC and non-GC B cells). We found one common clone with sequence similarities between GC and NGC cell populations in SQE and Alum condition (**Figure 4C**). The proportions of cells with different length of CDRH3 were relatively similar in Alum and SQE conditions (**Figure 4D**). We represented the most frequent CDRH3 and CDRL3 sequences in SQE condition compared to Alum function (**Figure 4E and 4F respectively**). Interestingly, sequences generated in SQE were distinct

from the one generated in Alum condition. These results showed the major differences in amino-acid alignment between conditions.

In order to verify if the Ab sequences were specific to W614A-3S, we cloned and produced recombinant monoclonal IgG1 with completed V(D)J sequencies among the most frequent one in SQE condition. All monoclonal Abs were specific of W614A-3S peptide (**Figure 4G**). However, some of them (clone 691W11_S_GC, 573W11_S_GC) showed lower affinity. None of these selected, cloned and produced specific monoclonal Abs were able to neutralize HIV (data not shown). Despite this disappointing data, the single-cell V(D)J sequencing of W614A-3S-specific BCR validate the dichotomy in BCR sequences between SQE and Alum formulation of our vaccine candidate.

Altogether, both approaches using single-cell analysis of gene expression and BCR sequencing revealed that even though W614A-3S-specific B cells (IgG1^+) were detected following both formulations, the gene expression, B cell differentiation and BCR selection were distinct.

Discussion

We propose here gp41-based peptide HIV vaccine coupled with a carrier protein (CRM197) and formulated in SQE as novel vaccine candidate capable of inducing broadly neutralizing antibodies. We demonstrated that the formulation of the novel candidate vaccine W614A-3S-CRM197 with either Alum or SQE, impacts the quantity and quality of B lymphocytes. These differences result in 1) the induction of non-neutralizing antibody responses for the Alum formulation versus the production of NAb for the SQE formulation, which were capable of neutralizing a wide range of HIV-1 strains including Tier 1 and Tier 2 viruses (73-93% breadth); 2) major differences in proportion of differentiated B cell expressing GC B cell associated genes, and 3) distinct amino-acid CDR3 region.

Broadly neutralizing Abs (bNAbs) generally arise late in the course of HIV infection. The most mature bNAbs revealed one or more unusual features, such high levels of somatic hypermutation (SHM), unusually long complementary-determining regions like CDRH3 and polyreactivity for non-HIV-1 antigens (Kwong and Mascola, 2012; Mouquet and Nussenzweig, 2012; Scheid et al., 2009). It is difficult to establish the generality of these observations, and if they were required for the development of bNAbs. But these features reveal a long and intensive process of B cell selection. It's necessary to elicit a similar antibody response by vaccination strategies. We published the presence of anti-W614A-3S NAbs was rarely observed HIV-1 progressors, but significantly increased in untreated long-term non-progressor (LTNP) patients, of the ALT ANRS cohort that are infected more than 7 years but did not declare the disease (Lucar et al., 2017). These anti-W614A-3S are found in the strong association both with viral load and viral DNA and able to neutralize most of HIV-1 clade B tested. HIV vaccine studies are currently based on the Env protein in a trimeric form. However, other approaches have provided evidence for a peptide epitope-based vaccine. Recently, the discovery of Abs against the fusion-peptide (FP) with neutralizing breadth brings promises for a vaccine candidate (Xu et al., 2018). In mice, the FP elicited monoclonal Abs capable of neutralizing 31% of a cross-clade panel of 208 HIV-1 strains. Crystal structure and cryoelectron microscopy structures of these antibodies revealed FP diversity as a molecular explanation of cross-clade neutralization in macaque and guinea pigs (Xu et al., 2018).

We have chosen two main adjuvants that can be translated into human clinical studies, Alum and SQE formation as both adjuvants are based on human licensed product formulation. Our SQE formulation is based AddaVaxTM which is a squalene-based oil-in-water nano-emulsion based of the formulation of MF59® that has been licensed in Europe for adjuvanted flu vaccines (Mbow et al., 2010). In the context of pandemic influenza vaccine, MF59 adjuvanted allow to induce broadly cross-reactive antibodies (Galli et al., 2009). SQE formulation of our

HIV vaccine candidate allowed to induce bNabs with 65-90% breath of neutralization of Tier 1 and Tier 2 HIV strains whereas Alum formulation induced Abs without detectable neutralizing activities. The mechanism remains unknown. This class of adjuvants is believed to act through a depot effect, enhancement of antigen persistence at the injection site, recruitment and activation of antigen presenting cells, and direct stimulation of cytokine and chemokine production by macrophages and granulocytes (Mbow et al., 2010). Because it is known that MF59® increases GC B Cell differentiation and also induces persistent high-affinity functional Ab titers (Lofano et al., 2015).

We further investigated the impact of Alum and SQE formulation of W614A-3S-CRM197 vaccine on B cell differentiation. In non-human primates, higher frequencies of total and Env-specific GC-Tfh cells accompanied by larger and more diverse Env-specific B-cell lineages were found after slow delivery of antigen (Cirelli et al., 2019). It has also been proposed that Squalene Oil-in-water emulsion facilitated a rapid antibody response in contrast to aluminum hydroxide due to different kinetic of delivery of antigen to the lymphoid organs (Pedersen et al., 2020). In influenza vaccine, Squalene-based emulsion adjuvants increase the antibody affinity against the hemagglutinin-based vaccine and breadth of B cell responses leading to protection across virus clades (Nguyen-Contant et al., 2021).

We then used single-cell qRT-PCR approach to compare gene expression of W614A-3S-specific single-B cells between the two formulations. We identified Germinal Center (GC) B cells (high expressing Bcl6 (Fukuda et al., 1997), Fas (Smith et al., 1995), Efnb1(Lu et al., 2017) and Id3 (Gloury et al., 2016)), plasma cell precursors (high expressing Prdm1, Irf4, Cd69 and Myc) and 3 different memory B-cell populations according to the literature definition (McHeyzer-Williams et al., 2015b; Ridderstad and Tarlinton; Shi et al., 2015). Our data showed that the proportion of GC B cells as defined by single-cell gene expression was significantly higher when W614A-3S vaccine was formulated in SQE. Whereas plasma cell precursors were significantly higher following Alum formulation. Thus, qualitative and

quantitative difference in proportion of differentiated B cells were evidenced by single-cell analyses.

The single-cell V(D)J sequencing of W614A-3S-specific BCR validates the dichotomy between SQE and Alum formulation of our vaccine candidate. Significant diversity of B cell repertoire of Germinal Center and Non-Germinal Center B cells were observed following W614A-3S-KLH vaccination using SQE compared to Alum formulations. Among cloned Ab according to the defined sequence, we did not find any neutralizing activities. There are some limitations in our study notably in regard to BCR sequencing for detection of NAbs. Indeed, we used W614A-3S peptide-conjugated with biotinylated with ovalbumine in order to purify antigen-specific B cells that might impact on the selection of certain BCR during this step. Of note, vaccination with a W614A- 3S peptide in IFA induces in animals neutralizing anti-HIV-1 Abs among which we found a unique clone F8 by hybridoma generation (Dorgham et al., 2019) suggesting the rarity of B cell clone or technical challenges in purification of B cells.

Materials and methods

Animals

BALB/cByJ female mice were purchased from Janvier Labs and were housed at free animal facility (Centre d'Experimentation Fonctionnelle (CEF) of Sorbonne University, France) under specified pathogen-free conditions and used for experiments at 6-10 weeks old. New Zealand rabbits were housed at Covalab company (France). All experiments protocols were approved by French animal experimentation and ethics committee and validated by Service Protection et Santé Animales, Environnement, with the number 00954.02 and APAFIS#5863 – 2016062710255883 v3 for mouse experiments.

Immunizations and vaccinal antigens

Rabbits were received 50 µg of the peptide W614A-3S coupled with CRM197 by intramuscular route at Week 0 (W0), W2, W4 and W10. Mice were received 10 µg of peptide coupled with Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH; Covalab) carrier protein or 11.7 µg of W614A-3S peptide coupled with CRM197 (Minka Therapeutics) by intramuscular injections (in both quadriceps of left and right thighs) at the same kinetic (or W18 for mouse CRM197 experiments). W614A-3S peptide (NH₂-PWNASASNKSLDDIW-COOH) is a mutated peptide of HIV-1 gp41 (Petitdemange et al., 2013b). The antigen was administered with PBS1X (Life technologies), Aluminum hydroxide (Alum; 100 µg for mouse and 250 µg for rabbit; Alhydrogel 2.0%; Invivogen) or Squalene emulsion (2.5% v/v for mouse and rabbit; Polymun).

Antibody detection

Sera were collected before first injection and at different time points after each immunization (W4, W6, W10, W12, W14 and W20 for rabbits; W3, W5, W8 and W20 for mice), and stored at -80°C before evaluation of W614A-3S-specific IgG titration by ELISA. MaxiSorp-plates (Corning) were coated overnight with 50 ng/well of W614A-3S peptide (Covalab). For W614A-3S-monoclonal Abs evaluation, plates were coated with 50 ng/well of W614A-3S-KLH vaccine. Wells were saturated with PBS1X + 1% Bovine Serum Albumin (LifeTechnologies) before serum serial dilutions of 1/10 or different dilutions of W614A-3S-monoclonal Abs (32,000 to 0.97 ng/ml). All samples were tested in duplicates. Peptide-specific Abs were revealed by Horse Radish Peroxydase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (1/10,000; Southern Biotech) or detection antibody biotinylated anti-rabbit IgG (1/5,000; Jackson ImmunoResearch) followed by HRP-Streptavidin (1/200; R&D Systems). Enzymatic activity was measured by adding tetramethylbenzidine (TMB; Pierce Endogen) and stopped

by 1N H₂SO₄. Optical density (OD) of each well was monitored at 450 nm with a FlexStation 3 ELISA reader (Molecular Devices) and Ascent Software version 2.6. EC50 were calculated by sigmoidal dose response (Prism-9 software). For NAb assay, serum purified W614A-3S-specific Abs were obtained as described (Petitdemange et al., 2013b). A pool of 4-5 sera was used for mouse purified NAb evaluation. Viral titration and TZMbl neutralization assays were performed as previously described (Heyndrickx et al., 2012; Sarzotti-Kelsoe et al., 2014).

Cell phenotype and isolation

Draining lymph nodes (dLN; inguinal) were harvested 7 days after each immunization. Cells were stained with W614A-3S coupled with biotinylated Ovalbumin protein (Covalab) 30 min at room temperature before cell surface antigen staining with a standard method after receptor Fc blocking with CD16/CD32 (clone 2.4G2; BD Biosciences), and the following anti-mouse Abs: CD3e (clone 145-2C11; eBioscience), CD45R/B220 (clone RA3-6B2), CD19 (clone 1D3), IgG1 (clone A85-1), IgD (clone 11-26c.2a), T- and B-cell Activation Antigen (clone GL7) and streptavidin (BD Biosciences). For cell analysis, dead cells were excluded by using the LIVE/DEAD fixable kit (Molecular Probes). Cells were analysed by BD LSR Fortessa flow cytometry or isolated by BD FACSaria II sorter. A pool of 5 mice per condition at W3 and W5, was used for W614A-3S-specific B cell isolations (BioMark Dynamic array). A pool of 25 mice per condition at W11 was used for W614A-3S-specific IgG1⁺ Germinal Center (GC; GL7⁺IgD^{Low}) and Non-Germinal Center (NGC; GL7IgD⁺) B cell isolations (Chromium Single cell V(D)J assay).

Gene expression analysis of single-cells.

Single-cell gene expression analysis was performed using the BioMark 96.96 Dynamic Array IFCs and the Biomark HD System from Fluidigm. Two-step single-cell gene delta gene expression were performed by using EvaGreen Supermix according to Fluidigm Real-Time PCR protocol. Briefly reverse transcription by using 2-step VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen) was performed directly on single-cell, before specific target cDNA amplification. Probes for 96 genes were selected from the catalogue of delta gene expression assay (Fluidigm; **Table S1**). Processing of the IFCs and operation of the instruments were performed according to the manufacturer's procedures. Thirty cycles of PCR were performed using the Biomark microfluidic chip (Fluidigm). The automated analysis of data was performed with Singular Analysis Toolset (v3.6) compatible with R software. We have merge data from 2 chips (of two experiments) per conditions ($n=184\text{-}188$ cells). Results of negative control (no cell) or positive control samples (10 cells) and probe controls or not amplified probes were removed before analysis using UMAP regression, heatmap after standard normalization, FlowSOM Elbow Metaclustering and volcano plot EdgeR analysis (OMIQ Data Science Platform).

V(D)J repertoire and gene expression profiling

W614A-3S-specific IgG1⁺ GC and NGC B cells at W11 were loaded according to the manufacturer's instructions for the Chromium Single cell V(D)J reagent kits (10X Genomics) to attain between 500 to 10,000 cells per well. Library preparation for V(D)J sequencing was performed according to the manufacturer's protocol (Chromium Single cell V(D)J enrichment kit, mouse B cell) prior to sequencing on the Illumina MiSeq. Quality of raw reads was assessed using FastQC 0.11.8 quality control tool before Cell Ranger 3.1.0 V(D)J running. Only clonotypes with exactly one heavy and one light chain are considered. CDRH3 and CDRL3 sequence alignments were performed with Unipro UGENE software.

Monoclonal antibody production

V(D)J sequences of W614A-3S-specific GC and NGC B cells were chosen among Squalene condition. Sixteen monoclonal antibodies were produced by ProteoGenix company. An endotoxin-free DNA preparation was done for the pTXs1 expression constructions before XtenCHOTM transient expression. The recombinant Ab was purified by affinity vs.protein G. After production, specificity by ELISA and neutralization assay were performed.

Statistics

Statistical analyses and graph representation were performed using either GraphPad Prism 9, FlowJo X, OMIQ, or Unipro UGENE software. Two-way ANOVA test was used for kinetic peptide-specific IgG evaluation. Mann-Whitney tests were used to compare SQE and Alum conditions.

Authors contributions:

BC and VV designed the study. OB, CC, MT, MB, LB and VV experimental work, contributed to data acquisition, analysis and interpretation. SB and JN compiled and analyzed the single-cell data. ES and DK was responsible for adjuvant production and quality control. MB and GS were responsible of neutralization assays and analysis. BC, PD, GS, DK and VV provided financial support. BC, OB wrote the manuscript. All authors contributed to reviewing the manuscript.

Acknowledgments

We thank Maxence Mouille for technical help.

References

1. Mascola JR, Montefiori DC. The Role of Antibodies in HIV Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28(1):413–444.
2. Pilgrim AK et al. Neutralizing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary Infection and Long-Term-Nonprogressive Infection. *J INFECT DIS* 1997;176(4):924–932.
3. Bonsignori M et al. Antibody-virus co-evolution in HIV infection: paths for HIV vaccine development. *Immunological Reviews* 2017;275(1):145–160.
4. Sok D, Burton DR. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nature Immunology* 2018;19(11):1179–1188.
5. Falkowska E et al. Broadly Neutralizing HIV Antibodies Define a Glycan-Dependent Epitope on the Prefusion Conformation of gp41 on Cleaved Envelope Trimers. *Immunity* 2014;40(5):657–668.
6. Klasse PJ et al. Epitopes for neutralizing antibodies induced by HIV-1 envelope glycoprotein BG505 SOSIP trimers in rabbits and macaques. *PLoS Pathog* 2018;14(2):e1006913.
7. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* 2004;4(3):199–210.
8. Vieillard V, Strominger JL, Debre P. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005;102(31):10981–10986.
9. Petitdemange C et al. A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clinical Infectious Diseases* 2013;57(5):745–755.
10. Lucar O et al. Neutralizing Antibodies Against a Specific Human Immunodeficiency Virus gp41 Epitope are Associated With Long-term Non-progressor Status. *EBioMedicine* 2017;22:122–132.
11. Montefiori DC. Measuring HIV Neutralization in a Luciferase Reporter Gene Assay [Internet]. In: Prasad VR, Kalpana GV eds. *HIV Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009:395–405
12. deCamp A et al. Global Panel of HIV-1 Env Reference Strains for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*

- 2014;88(5):2489–2507.
13. Suan D et al. CCR6 Defines Memory B Cell Precursors in Mouse and Human Germinal Centers, Revealing Light-Zone Location and Predominant Low Antigen Affinity. *Immunity* 2017;47(6):1142-1153.e4.
 14. Scheid JF et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 2009;458(7238):636–640.
 15. Kwong PD, Mascola JR. Human Antibodies that Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies. *Immunity* 2012;37(3):412–425.
 16. Mouquet H, Nussenzweig MC. Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012;69(9):1435–1445.
 17. Xu K et al. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nature Medicine* 2018;24(6):857–867.
 18. Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology* 2010;22(3):411–416.
 19. Galli G et al. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106(19):7962–7967.
 20. Lofano G et al. Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J.I.* 2015;195(4):1617–1627.
 21. Cirelli KM et al. Slow Delivery Immunization Enhances HIV Neutralizing Antibody and Germinal Center Responses via Modulation of Immunodominance. *Cell* 2019;177(5):1153-1171.e28.
 22. Pedersen GK, Wørzner K, Andersen P, Christensen D. Vaccine Adjuvants Differentially Affect Kinetics of Antibody and Germinal Center Responses. *Front. Immunol.* 2020;11:579761.
 23. Nguyen-Contant P, Sangster MY, Topham DJ. Squalene-Based Influenza Vaccine Adjuvants and Their Impact on the Hemagglutinin-Specific B Cell Response. *Pathogens* 2021;10(3):355.
 24. McHeyzer-Williams LJ, Milpied PJ, Okitsu SL, McHeyzer-Williams MG. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nature Immunology* 2015;16(3):296–305.
 25. Shi W et al. Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat Immunol* 2015;16(6):663–673.
 26. Ridderstad A, Tarlinton DM. Kinetics of Establishing the Memory B Cell Population as Revealed by CD38 Expression. *The Journal of Immunology* :8.

27. Fukuda T et al. Disruption of the Bcl6 Gene Results in an Impaired Germinal Center Formation. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186(3):439–448.
28. Smith KG, Nossal GJ, Tarlinton DM. FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen.. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995;92(25):11628–11632.
29. Lu P, Shih C, Qi H. Ephrin B1-mediated repulsion and signaling control germinal center T cell territoriality and function. *Science* 2017;356(6339):eaai9264.
30. Gloury R et al. Dynamic changes in Id3 and E-protein activity orchestrate germinal center and plasma cell development. *Journal of Experimental Medicine* 2016;213(6):1095–1111.
31. Dorgham K et al. Reverse Immunology Approach to Define a New HIV-gp41-Neutralizing Epitope. *Journal of Immunology Research* 2019;2019:1–13.
32. Breden F et al. Comparison of Antibody Repertoires Produced by HIV-1 Infection, Other Chronic and Acute Infections, and Systemic Autoimmune Disease. *PLoS ONE* 2011;6(3):e16857.
33. Heyndrickx L et al. International Network for Comparison of HIV Neutralization Assays: The NeutNet Report II. *PLoS ONE* 2012;7(5):e36438.
34. Sarzotti-Kelsoe M et al. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *Journal of Immunological Methods* 2014;409:131–146.

Figures

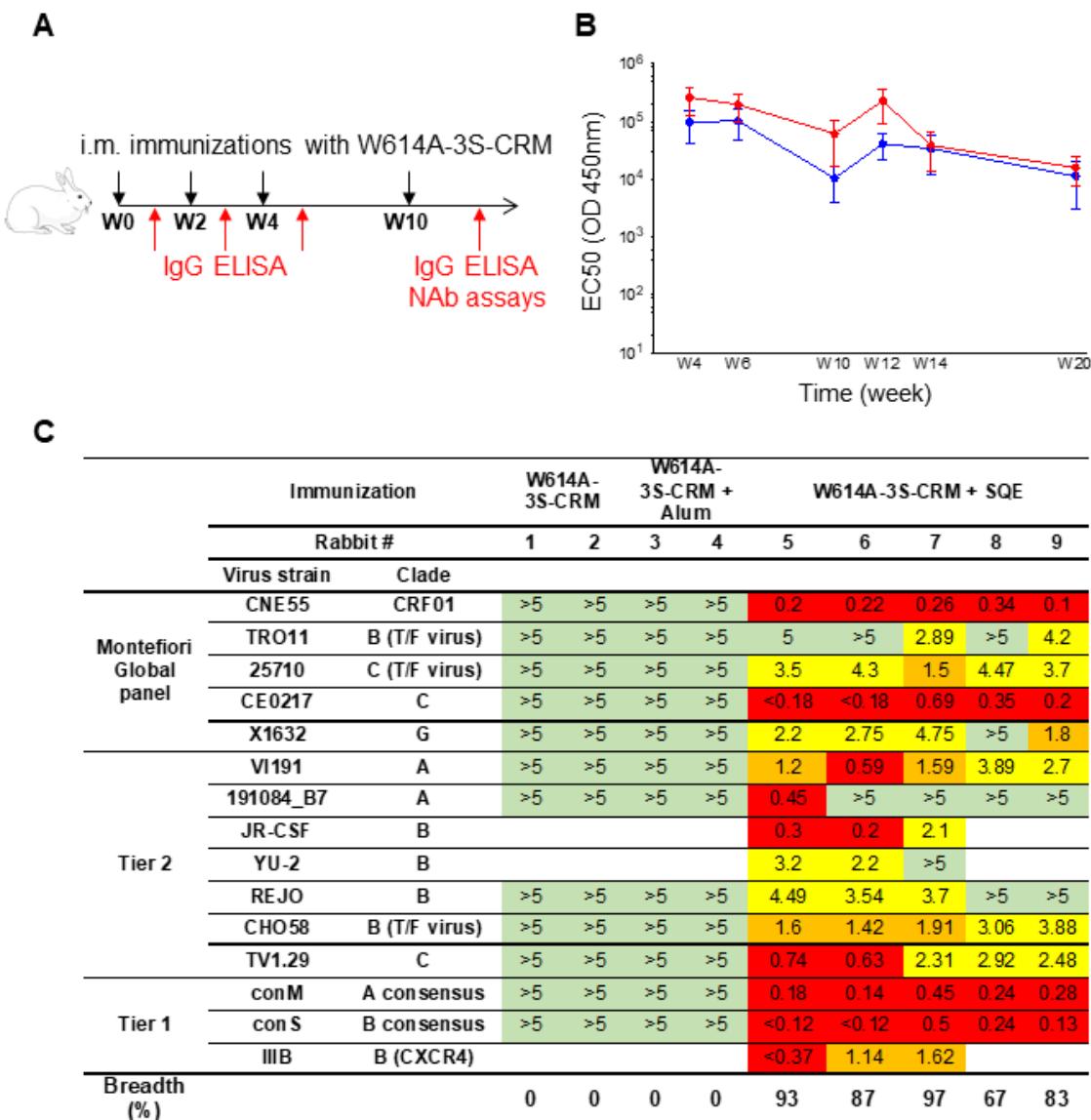
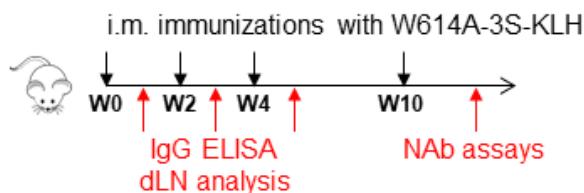


Figure 1: Broadly NAb induction after Squalene-adjuvanted W614A-3S peptide vaccination.

(A) Experimental schedule of rabbit immunizations and biologic samples. Animals were vaccinated at Week 0 (W0), W2, W4 and W10 (black arrows), and blood samples collection (red arrows). (B) Rabbits were immunized with W614A-3S-CRM197 carrier non adjuvanted (n=5), adjuvanted with Aluminium hydroxide (Alum) (n=5) or Squalene emulsion (SQE) (n=5). Kinetics of serum W6141-3S-specific IgG of rabbits, immunized with W614A-3S-

CRM197 carrier adjuvanted with Alum (blue) or SQE (red). Graph represents EC50 mean +/- SEM of OD 450nm; graph's y-axis is in log 10 scale. Statistical analyses were performed with two-way ANOVA between two adjuvanted conditions. (C) Serum purified W614A-3S-specific IgG per condition were purified at W20, and neutralizing IC50 were evaluated against different virus strains: Montefiori Global panel (deCamp et al., 2014b), Tier2 and Tier1. Color codes of neutralization assay (IgG µg/ml): green, >5; yellow, 4.9-2; orange, 1.9-1 and red, <0.9. Breadths represent percentage of total tested HIV strains neutralized by anti-W614A-3S IgG. T/F: Transmitted Founder virus.

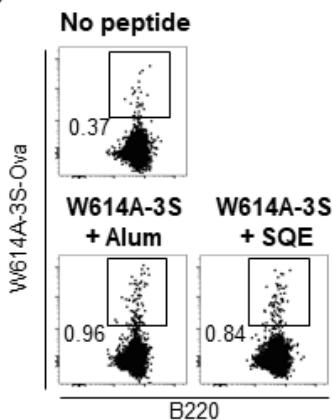
A



B

Immunization	W614A-3S-KLH		W614A-3S-KLH + Alum		W614A-3S-KLH + SQE	
	Mouse pooled serum #	1	2	3	4	5
Virus strain	Clade					
Tier 2	JR-CSF	B	>2	>2	>2	>2
					0.2	0.1

C



D

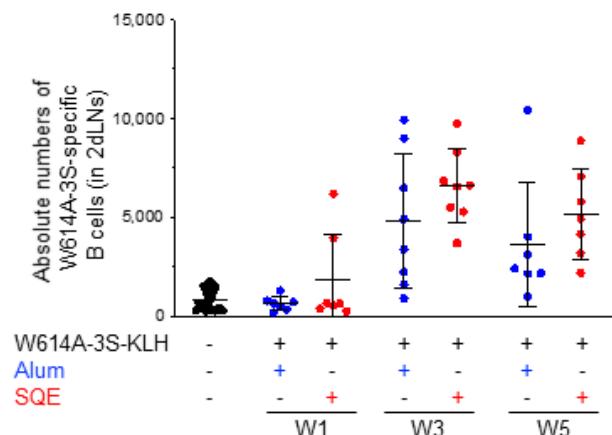


Figure 2: Validation of neutralizing Abs in mouse models and detection of W614A-3S-specific B cells.

(A) Experimental schedule of mouse immunizations and biologic samples. Animals were vaccinated with W614A-3S-KLH carrier non adjuvanted, adjuvanted with Alum or SQE at Week 0 (W0), W2, W4 and W10 (black arrows), and blood samples collection or draining lymph node (dLN) analysis were made after each injection (red arrows). **(B)** Neutralizing IC₅₀ of serum purified W614A-3S-specific IgG were evaluated at W11 against Tier 2 virus JR-CSF strain. Purified peptide-specific IgG were obtained by pooling sera of 4-5 mice for each condition. Color codes of neutralization assay (IgG µg/ml): green, >2; orange, 1.9-1 and red, <0.9. **(C)** Representative dot plots of W614A-3S-specific B cells in dLNs after 3 immunizations with PBS or W614A-3S-KLH adjuvanted with Alum or SQE. Numbers represent peptide⁺ cell percentages of B cells. **(D)** A dot plot with mean +/- SD (n=7-23) represents the absolute numbers of W614A-3S-specific B cells in two dLNs, one week after first (W1), second (W3) and third (W5) immunizations with PBS (black), W614A-3S-KLH adjuvanted with Alum (blue) or SQE (red). Statistical analyses used the Mann Whitney *U* test.

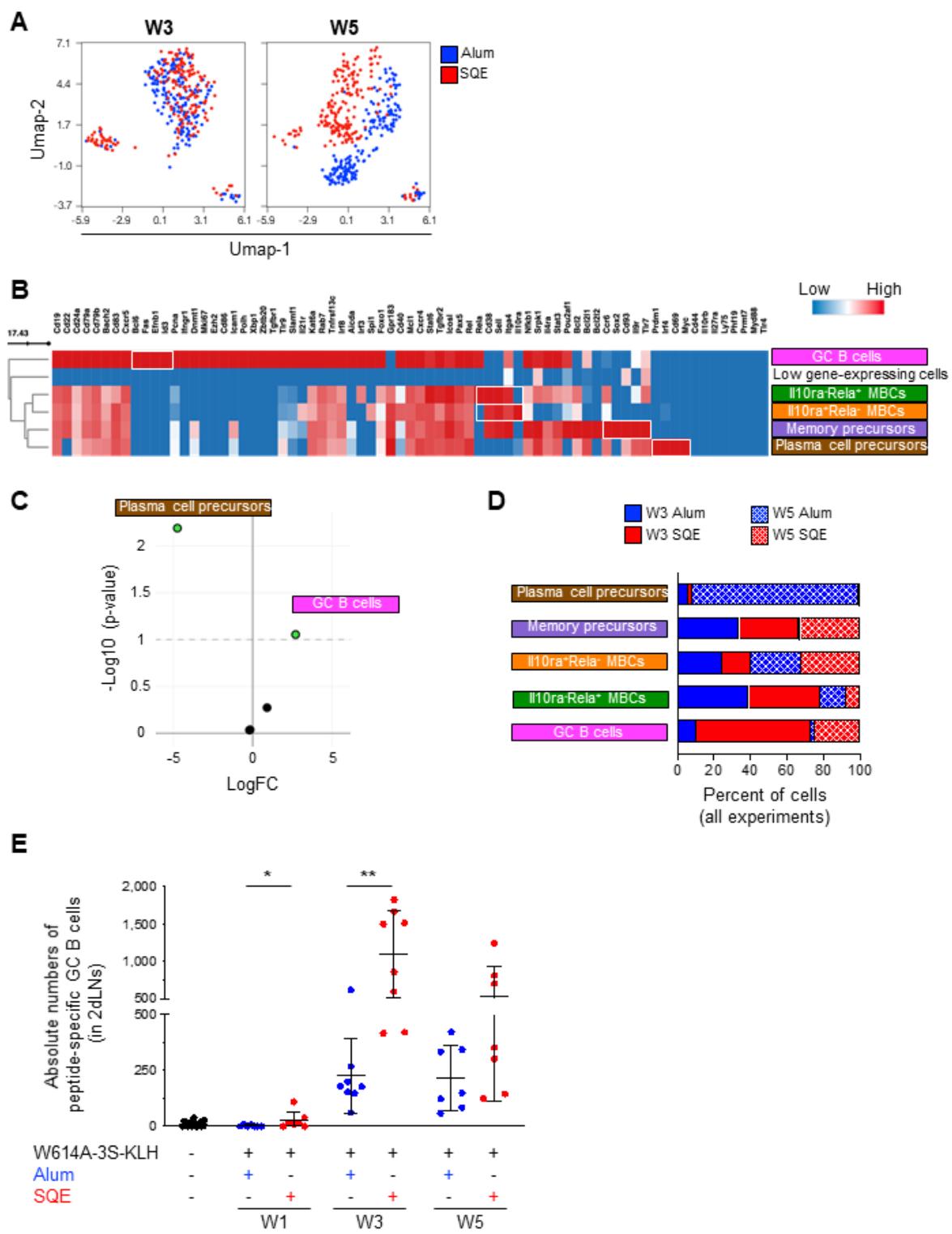


Figure 3: Differential W614A-3S-specific B cell populations after adjuvanted vaccination.

Mice were immunized with W614A-3S-KLH adjuvanted with Alum (blue) or SQE (red) at W0, W2 and W4. Draining lymph nodes (dLN_s; n= 5 mice for each condition and for 2 independent experiments per condition) were harvested at W3 and W5, and used to isolate

peptide-specific B cells and performed single-cell gene expression analysis. **(A)** Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plots were generated by concatenation of 747 single-cells from Alum condition (n=375 cells) and Squalene condition (n=372 cells) across W3 (left UMAP) and W5 (right UMAP) for 73 gene expression. Each point depicts a single-cell, colored according to condition designation. **(B)** Heatmap showing the medians of gene expression after concatenate W3 and W5 conditions for 6 different clusters, discriminated by using FlowSOM algorithm. One cluster represented few cells (38 of 747 cells) and showed a very low gene expression; it was removed of the rest of analyses (cells at the bottom right of UMAP). Blue indicates lower expression; red indicates higher expression. Population names were identified by specific over or under gene expression (white frame). **(C)** Volcano plot (Log fold change (FC) versus -Log10 (p-value)) depicting 5 different clusters indicating Empirical analysis of Digital Gene expression between adjuvanted conditions. Green points represent significant difference with p-value threshold <0.1. **(D)** Graph represent cell percentages for each condition (Alum at W3, solid blue; SQE at W3 solid red; Alum at W5, wire blue and SQE W5, wire red), based on 100% of evaluated cells (n= 97 plasma cell precursors; n= 224 memory B cell precursors; n= 268 Il10ra⁺Rela⁻ memory B cells (MBCs); n= 64 Il10ra⁻Rela⁺ MBCs; and n= 56 germinal center (GC) B cells). **(E)** A dot plot with mean +/- SD (n=7-13) represents the absolute numbers of W614A-3S-specific GC B cells in two dLNs, at W1, W3 and W5. Statistical analyses used the Mann Whitney *U* test and statistical significances is indicated between adjuvanted conditions: *p<0.05; **p<0.01.

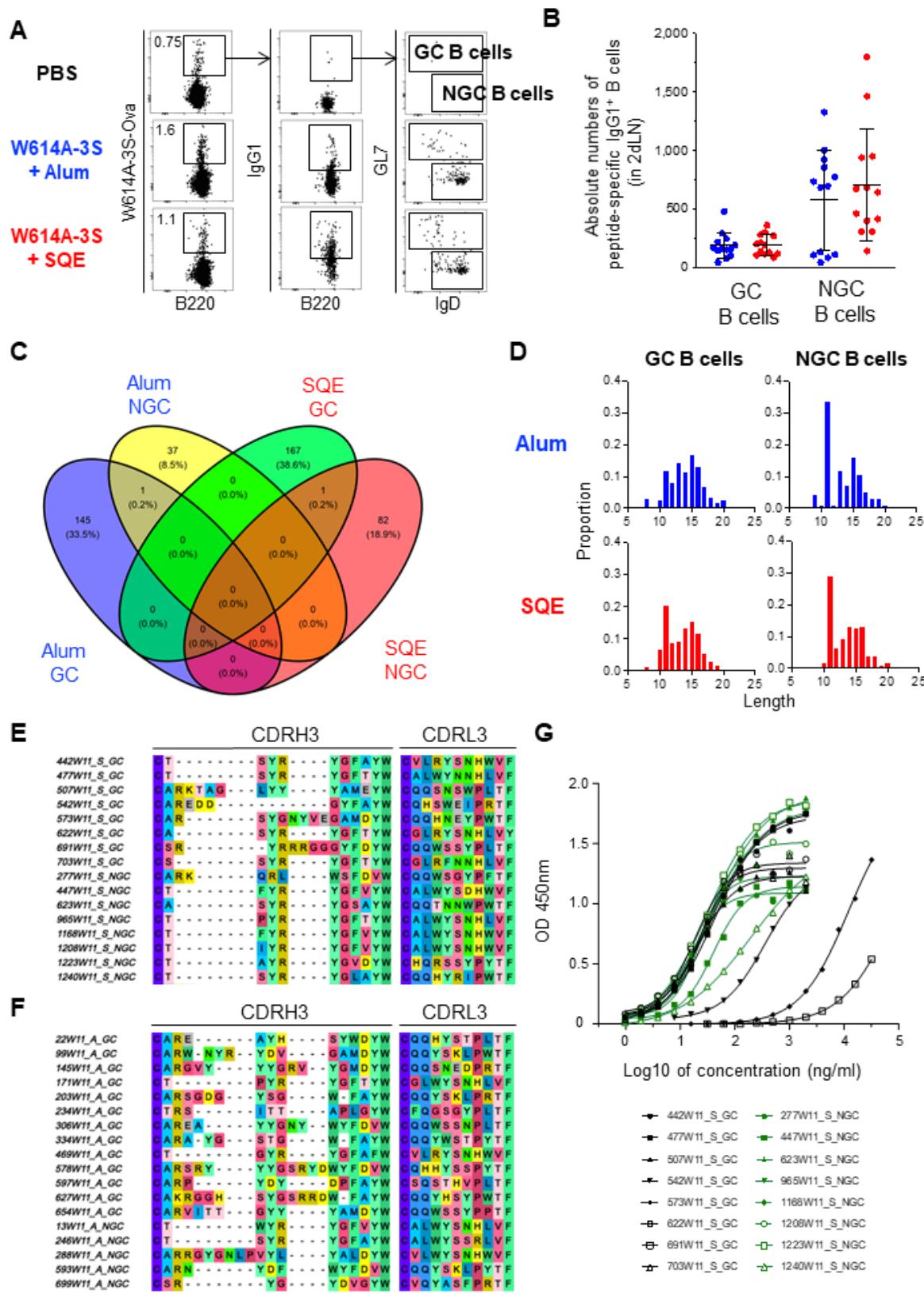


Figure 4: Repertoire diversity of Germinal Center and Non-Germinal Center B cells after adjuvanted vaccination.

Mice were immunized with W614A-3S-KLH adjuvanted with Alum (blue) or SQE (red) at W0, W2, W4 and W10. **(A)** Representative dot plots of gating strategy for W614A-3S-specific IgG1⁺ Germinal Center (GC) and Non-Germinal Center (NGC) B cells sorting after 4 immunizations. Numbers represent peptide⁺ cell percentages of B cells. **(B)** A dot plot with mean +/- SD (n=7-13) represents the absolute numbers of W614A-3S-specific IgG1⁺ GC and NGC B cells in two dLNs, one week after fourth immunizations (W11). Statistical analyses used the Mann Whitney *U* test. **(C)** For W614A-specific IgG1⁺ B cell repertoire analyze, 2 dLNs of 25 mice per condition were pooled at W11. Venn diagram of differentially abundant CDRH3 (heavy chain) + CDRL3 (light chain) sequences (number and percentage) per condition (GC B cells of Alum condition, blue; NGC B cells of Alum condition, yellow; GC B cells of SQE condition, green; NGC B cells of SQE condition, red). **(D)** Distribution of CDRH3 amino acid (aa) lengths for all clonotypes of GC B cells (left graphs) and NGC B cells (right graphs) for Alum condition (blue; upper graphs) and SQE condition (red; lower graphs). **(E)** Representative sequences of CDRH3 and CDRL3 of higher clonotype frequencies for SQE condition. The V(D)J of these clonotypes were used for 16 clonal IgG production. **(F)** Representative sequences of CDRH3 and CDRL3 with clonotype frequencies greater than one for Alum condition. **(G)** Anti-W614A-3S specificity of 16 clonal IgG1 titers (from SQE condition) were measured by ELISA. Graph represent OD450nm versus log10 of IgG1 concentration (ng/ml). Eight clonal IgG1 issued from GC B cells (black) and eight clonal IgG1 issued from NGC B cells (green) were produced and evaluated.

Supplementary Table

Supplemental Table 1: List of 73 genes and probe sequences used for the interrogation of peptide-specific single B cells. Related to Figure 3.

Gene Symbol	Forward Primer	Reverse Primer
Aicda	CCTGGGAAGGGCTACATGAAA	CGCAAGTCATCGACTTCGTAC
Bach2	GGTGGACAGACGAAAGATGAC	AACTGTAGCAGTGGCCAAA
Bcl2	ATGTGTGAGAGCGTCAA	GATGCCGGTTCAAGGTACTCA
Bcl21	AGCGTAGACAAGGAGATGCA	AGGCTCTAGGTGGTCATTCA
Bcl22	GTCCTAAGAGCTGCCATCCA	AGCCTACAAAGTCAGCCACTA
Bcl6	GGGAAACCCAGTCAGAGTA	CTCAGAGAAACGGCAGTCAC
Ccr6	AAGGCACATATGCGGTCAAC	CCTGGACGATGGCAATGTAC
Cd19	CCATCGAGAGGCACGTGAA	ACCACTGGGACTATCCATCCA
Cd22	CTCTTGCTTGGCAGAGAAC	GCTCTGAATCACTGTGGTCAC
Cd24a	GCAGATCTCCACTTACCGAAC	CACTGCCAGAACAGCAA
Cd28	CTGCTGTTCTGGCTCTCAAC	GGGCGACTGCTTACCAAAA
Cd38	AGACTACGCCCACTTGTAA	CAGGTGTTGGATTTGCTCCA
Cd40	CTATGGGCTGCTGTTGAC	TCGTGGAGGTACTGTTGTC
Cd44	TTCTTCGATGGACCGGTTA	TACTCGCCCTTCTGCTGTA
Cd69	GTGGTCCATCACGTCCTTA	ACAAGCCTGGCAATTGTAC
Cd79a	AAGAACACAGGGCTTGTA	CATGTCAGGAAGGGCTTA
Cd79b	TTCATATTGTCGCCATCTTCC	AGGTGTGATCTCCTCCATCC
Cd83	CCG CAG CT CT CCTATGCA	AGCTGTTTGCTTGCTCTCC
Cd86	CATGGGCTTGGCAATCCTTA	CATTGAAATAAGCTTGCCTCC
Cd93	ACAGCTATTCTGGGTTCCA	AGCTGTCTAAGGCCACATA
Cxcr4	GGTAACCACCACGGCTGTA	CAGGGTTCTTGTGGAGTCA
Cxcr5	GGACATGGGCTCCATCACATA	TCCTCGACTGTAGAGCAGAA
Dnmt1	AGCCATTGGCCTGGAGATTA	GCAGCCTCCTCTTTGCTTTA
Efnb1	CGTGCCTGGAGCTCTCTAA	TGATGTCCAGCTTGCTCCAA
Ezh2	TGATGGAAAAGTGCATGGTGA	GACCAAGAGCATTTACCAACTCC
Fas	TGTTTCCCTTGCTGCAGAC	CCGCCTCCTCAGCTTAAAC
Foxo1	GAAGAGCGTGCCTACTTCA	GGACAGATTGGCGAATTGAA
Gpr183	CAAACACGGACTGCCAACAC	GACGTTGCCAGTGGGGTA
Icam1	AGGGCTGGATTGTTCTTA	TGTCGAGCTTGGATGGTA
Icosl	GGCTCTCCACCAAGAACATCA	GGACGGGGACAAGGACTTTA
Id3	TCCTGCAGCGTGTACAGAC	CCTCTGCTCTGGAGATCACA
Ifngr1	CTGGGAATACCAAGAACATGTAC	TGCAGGAATCAGTCCAGGAA
Il10ra	AACTGGACCACCACTGAGAC	GCTTCAGAGTCACGCTATCC
Il10rb	AACAGGAGAGTGGAGTGAACC	TGATGGCCACAAATCCAGGAA
Il21r	AGTTCTTCCAGCCCCGTAA	AGGCCGTGAAAGGGTATTAA
Il27ra	ACAAGGAATGCCAGGCTGAA	GGTTCAGGTTCTGCATCTCA
Il4ra	AACATCTCCAGAGAGGACAACC	CTCAGCCTGGTCCCTGTA
Il9r	GCTACGAGCTGGCCTCAA	GCCAGGTCACTCCAACGATA
Irf3	TCCTGACACCAATGGCAAAA	CCCAAGATCAGGCCATCAAA

Irf4	TCCCCATTGAGCCAAGCATA	CGAGGATGTCCCGTAATACA
Irf8	GATATGCCGCCTATGACACA	CCCGTAGTAAAGCTGATGAC
Itga4	TTCCAGAGCCACACCCAAAA	GATGATGGAGCCCTCCAAGAA
Kat6a	CTGTCGTGACCAAGGAAAA	GGTCACAAACACTCCATGTGAAA
Ly75	ATGGAGCCGGAGTTCAACA	GAECTCTCGCCAAGGTACATCA
Mcl1	AAACGGGACTGGCTTGTCA	AGGTCCCTGTACGTGGAAGAAC
Mki67	GAGACATACCTGAGCCCATCA	GCTTGCTGCATTCCGAGTA
Myc	AGTGCTGCATGAGGAGACA	TCTCCACAGACACCACATCAA
Myd88	GCCTTGTAGACCGTGAGGATA	TCTGGTTCTGCTGCTTAC
NfkB1	ACCGTATGAGCCTGTGTTCA	GTAGCCTCGTGTCTCTGTCA
Pax5	GCCACCCCTCAGTATTCTTCCTAC	GGCTGCAGGGCTGTAATAGTA
Pcna	GACTTAGATGTGGAGCAACTTGG	AAATTCACCCACGGCATCT
Phf19	TCCATGAGGCTTGCACACA	ACACACGGAGCAGAAGAAC
Polh	TGACCCAGTTCACTGAATCCC	ACCTCGACACATGGCATACA
Pou2af1	AGAAGAAAGCGTGGCCATAC	GGCTGGTGGGGCAGTA
Prdm1	CGTTCGGTCAGCTCTCCAA	TGCAGGTCTGGCACTTGAAA
Prmt7	GTGTGGTACAGCCTTCAGAGAA	GAGCCTGACAGTCACACACA
Rab7	GGTGATGGTGGACGACAGAC	GCCACACCAAGAGACTGGAA
Rel	CTGCCTCCCATTGTTCTAAC	CTTGTTCACACGGCAGATCC
Rela	CCAGCGAATCCAGACCAACA	AGAGGCGCACTGCATTCAA
Sell	CAGAGAGACTTGCAGAGAGACC	TCCTCGAGCCCCAGTAAGTA
Spi1	AACAGATGCCACGCTCTCGATA	CATCCCCGGCATGTAGGAA
Slamf1	GCAATTCTGCAAGCAGCTGAA	AGGTCCCATTCTCGTTCTCC
Sox2	CGTAAGATGGCCAGGAGAA	CTCGGACAAAAGTTCCACTCC
Srk1	ACAGACCCCTGACAGAGAAC	TCCTGGCAATGGAATTGAC
Stat3	TGGGCATCAATCCTGTGGTA	CCAATTGGCGGCTTAGTGA
Stat6	TGACTTCCACAAACGCCCTAC	CATCTGAACCGACCAGGAAC
Tgfb1	AATTGCTCGACGCGTGTCTA	ACCGATGGATCAGAAGGTACA
Tgfb2	TCTGTGAGAAGCCGCATGAA	GGCAAAACCGTCTCCAGAGTAA
Tlr4	GTTCTCTCCTGCCTGACAC	GCTGAGTTCTGATCCATGCA
Tlr7	CCAAAGCACGCACTCAAA	CTGAGAAGGGAGCCAAGGAC
Tlr9	CGGGAGAATCCTCCATCTCC	CCTGTACCAGGAGGGACAA
Tnfrsf13c	TTCGACCCCTGAGAAAC	AGCTGTCCCAGGCTCCA
Xbp1	CAGCAAGTGGTGGATTGGAA	CAAGGCCGTGAGTTCTCC
Zbtb20	ACAAACTCTCACCGCTCACAC	CGAGCACGGAATTGCTGAA

Supplementary Figures

Immunization		W614A-3S-CRM	W614A-3S-CRM + Alum		W614A-3S-CRM + SQE					
			Rabbit #	1	2	3	4	5	6	
Montefiori Global panel	Virus strain	Clade								
	CNE55	CRF01	<20	<20	<20	<20	305	230	117	<20
	TRO11	B (T/F virus)	<20	<20	<20	<20	21	26	<20	<20
	25710	C (T/F virus)	<20	<20	<20	<20	32	20	<20	30
	CE0217	C	<20	<20	<20	<20	152	156	151	334
	X1632	G	<20	<20	<20	<20	33	36	30	<20
	VI191	A	<20	<20	<20	<20	69	152	86	<20
Tier 2	191084_B7	A	<20	<20	<20	<20	105	89	36	<20
	JR-CSF	B								
	YU-2	B								
	REJO	B	<20	<20	<20	<20	73	99	92	<20
	CHO58	B (T/F virus)	<20	<20	<20	<20	62	124	51	<20
Tier 1	TV1.29	C	<20	<20	<20	<20	54	106	81	<20
	conM	A consensus	<20	<20	<20	<20	237	351	409	201
	conS	B consensus	<20	<20	<20	<20	104	237	145	362
	IIIB	B (CXCR4)					31	<20	<20	
Breadth (%)			0	0	0	0	69	69	61	25
										25

Supplementary Figure 1: Rabbits were immunized with W614A-3S-CRM197 carrier non adjuvanted (n=2), adjuvanted with Alum (n=2) or SQE (n=5) at W0, W2, W4 and W10. Serum W614A-3S specific Abs of 2 to 5 rabbits per condition were analyzed at W20, and neutralizing IC50 were evaluated against different virus strains: Montefiori Global panel, Tier2 and Tier1. Color codes of neutralization assay (1/dilution): green, ≤40; yellow, 41-100; orange, 101-200 and red, >201. Breadths represent percentage of total tested HIV strain neutralized by anti-W6141-3S IgG. T/F: Transmitted Founder virus.

Immunization		W614A-3S-CRM + Alum	W614A-3S-CRM + SQE
Mouse pooled serum #		1	2
Virus strain	Clade		
Tier 2	JR-CSF	B	>2
	YU-2	B	>2

Supplementary Figure 2: Mice were immunized with W614A-3S-CRM197 carrier adjuvanted with Alum or SQE at Week 0 (W0), W2, W4 and W18. Neutralizing IC50 of serum purified W614A-3S-specific IgG were evaluated at W20 against two Tier 2 virus strains (JR-CSF and YU-2). Purified peptide-specific IgG were obtained by pooling sera of 5 mice for each condition. Color codes of neutralization assay (IgG mg/ml): green, >2; orange, 1-1.9 and red, <0.9.

2. Réponse innée : Résultats supplémentaires

Dans un second temps, toujours dans l'objectif de comprendre les mécanismes immunitaires qui permettent l'induction de la production d'anticorps neutralisants, nous nous sommes cette fois intéressée à la réponse innée. Les acteurs de la réponse immunitaire innée participent à l'activation du système immunitaire adaptatif et influencent l'intensité et la qualité de la réponse humorale. Nous avons fait l'hypothèse que les adjuvants peuvent avoir des impacts différents sur ces populations cellulaires qui expliqueraient les différences de qualité de la réponse humorale précédemment mises en évidence (article 1, publication en cours). Nous avons donc quantifié et qualifié ces acteurs par cytométrie en flux dans les compartiments impliqués dans la réponse humorale : le muscle qui est le site d'injection et le GLD où les LB matures pour la production d'anticorps spécifiques. Dans ce but, nous avons utilisé de nouveau le modèle murin d'immunisation avec le vaccin candidat W614A-3S couplé à une protéine carrier KLH et formulé avec l'adjuvant Alum induisant des anticorps non neutralisants ou avec l'adjuvant Squalene induisant des anticorps neutralisants à large spectre.

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la réponse immunitaire innée induite au niveau du site d'injection du vaccin, dans le muscle. Le muscle est un tissu pauvre en leucocytes à l'état basal. Nous avons donc quantifié les cellules leucocytaires CD45+ dans le muscle à des temps précoces (4h, jour 1 et jour 2) après immunisation par cytométrie en flux afin d'évaluer l'inflammation induite par les deux formulations vaccinales. Nous avons mesuré une augmentation du nombre de leucocytes au cours du temps dans les deux conditions mais avec un recrutement significativement supérieur un jour après immunisation avec la formulation Squalene par rapport à la formulation Alum (Figure 14A).

Nous avons ensuite caractérisé les populations leucocytaires dans différents compartiments impliqués dans la réponse vaccinale avec un intérêt particulier pour les populations de cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, macrophages et DC) et les neutrophiles. Les populations de neutrophiles caractérisés par l'expression du Ly6G et du Ly6C (Figure 14C) et de monocytes inflammatoires (ou classique) caractérisés par une forte expression du Ly6C et du CD11b (Figure 14B), sont les plus différentiellement affectés après immunisation dans le muscle et dans le GLD par la formulation Squalene et la formulation Alum aux temps précoces de la réponse immunitaire (Figure 14D-G). Après immunisation avec la formulation Squalene, les nombres de neutrophiles et de monocytes inflammatoires sont

significativement plus nombreux à 4h dans ces deux compartiments (Figure 14F-G). Un jour après immunisation, les nombres de neutrophiles et de monocytes inflammatoires diminuent drastiquement dans les ganglions dans la condition Squalene alors que leurs nombres au site d'injection augmentent fortement (Figure 14E, G). Aucune différence significative dans le nombre de cellules des populations n'est observée deux jours après immunisations entre les deux formulations dans le muscle et le GLD (Figure 14D-G) mais le nombre de monocytes inflammatoires continue d'augmenter au site d'injection pour les deux formulations.

Aux sites d'injection, les cellules sont recrutées en continu pendant les premiers jours qui suivent l'immunisation, et plus intensément après immunisation avec la formulation Squalene. Avec cette même formulation, les neutrophiles et les monocytes inflammatoires sont recrutés plus fortement dans le GLD, puis leur nombre diminue. Conformément à la littérature, la formulation Squalene induit donc une réponse immunitaire innée plus rapide et plus intense que la formulation Alum.

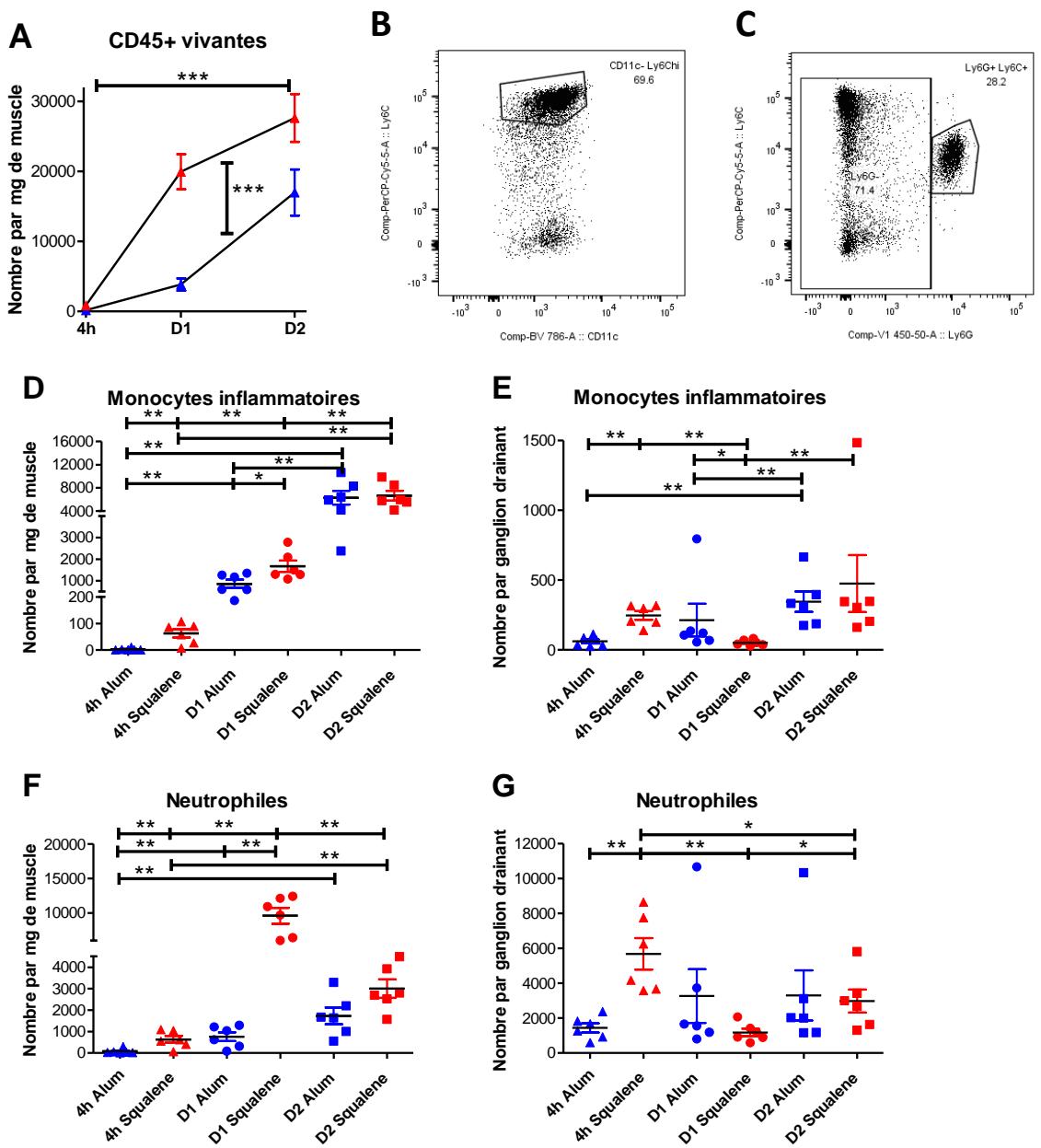


Figure 14 : Cinétique de la réponse innée dans différents compartiments.

A. Nombre absolu de leucocytes (CD45+) dans le muscle ($n = 3$ souris * 2 organes/condition) quantifiés par cytométrie en flux 4h, 1 jour D1 and 2 jours D2 après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé avec l'Alum (bleue) ou Squalene (rouge). **D-E.** Nombre absolu de monocytes inflammatoires (dot plot **B.**; CD45+ Ly6G- Ly6Chi CD11b+ CMH II- ; ligne supérieure) et de neutrophiles (dot plot **C.** ; CD45+ Ly6G+ Ly6C+ CD11b+ ; ligne inférieure) dans **D**, **F.** le muscle et **E**, **G.** le ganglion drainant ($n = 3$ souris * 2 organes/condition) quantifiés par cytométrie en flux 4h, 1 jour D1 et 2 jours D2 après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé avec l'Alum (bleue) ou Squalene (rouge). Analyses statistiques entre les différentes formulations : test Mann Whitney U. Significativité statistique est indiquée par : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Au vu de nos résultats dans les compartiments du muscle et du ganglion le drainant et de la littérature, nous nous sommes d'abord concentrés sur le rôle potentiel que peuvent jouer des neutrophiles dans la qualité de la réponse humorale. En effet les monocytes de type inflammatoire ont la capacité de migrer dans les tissus inflammés et de se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages, deux populations importantes dans les réponses immunitaires précoces et capables de présenter l'antigène. Le rôle des neutrophiles est également important dans la mise en place du microenvironnement inflammatoire pour le recrutement des cellules présentatrices d'antigène et leur activation. Leurs capacités à capturer et dégrader les antigènes et à migrer ont été montrées comme essentielles dans la mise en place des réponses adaptatives. Un nombre plus élevé de neutrophiles sont retrouvés précocement dans le GLD, l'organe où les cellules de la réponse innée interagissent avec les LT et les LB pour initier, moduler et orienter la réponse adaptative, après immunisation avec la formulation Squalene. Nous avons émis l'hypothèse que ces cellules sont activées différemment en fonction de la formulation et migrent ainsi avec différentes cinétiques et dans différents compartiments après immunisation (soit directement dans le ganglion, soit dans le ganglion puis dans le muscle). Dans un premier temps nous avons caractérisé l'état d'activation des neutrophiles au sein des GLD 4h après immunisation avec la formulation Squalene ou Alum par rapport à l'injection de PBS en contrôle. Nous avons évalué le niveau d'expression de différents marqueurs de surface décrits comme pouvant être affectée lors de l'activation des neutrophiles comme CD18, CD64, CD62L. Parmi ces marqueurs, l'expression du CD11b et du Ly6G est significativement plus faible alors que l'expression de CD62L est significativement plus forte après immunisation avec la formulation Squalene comparée à la formulation Alum (Figure 15A). De plus nous avons constaté une dichotomie dans l'expression du marqueur CD62L (Figure 15B) qui mène à la division en deux populations de neutrophiles, les neutrophiles CD62L+ et les neutrophiles CD62L- (Figure 15C). L'intensité de l'expression des autres marqueurs a ensuite été étudiée au sein des populations CD62L+ et CD62L- après immunisation avec la formulation Squalene ou Alum. Dans les deux cas, l'expression de CD11b et de Ly6G est significativement plus élevée sur les neutrophiles CD62L- (Figure 15D). La qualification des neutrophiles en fonction de leur expression de CD62L dans les GLD à différents temps après immunisation, montre une différence significative uniquement 4h après immunisation, donc

très précocement, avec un plus grand pourcentage de neutrophiles CD62L+ présents dans le GDL avec la formulation Squalene par rapport à la formulation alum (Figure 15E).

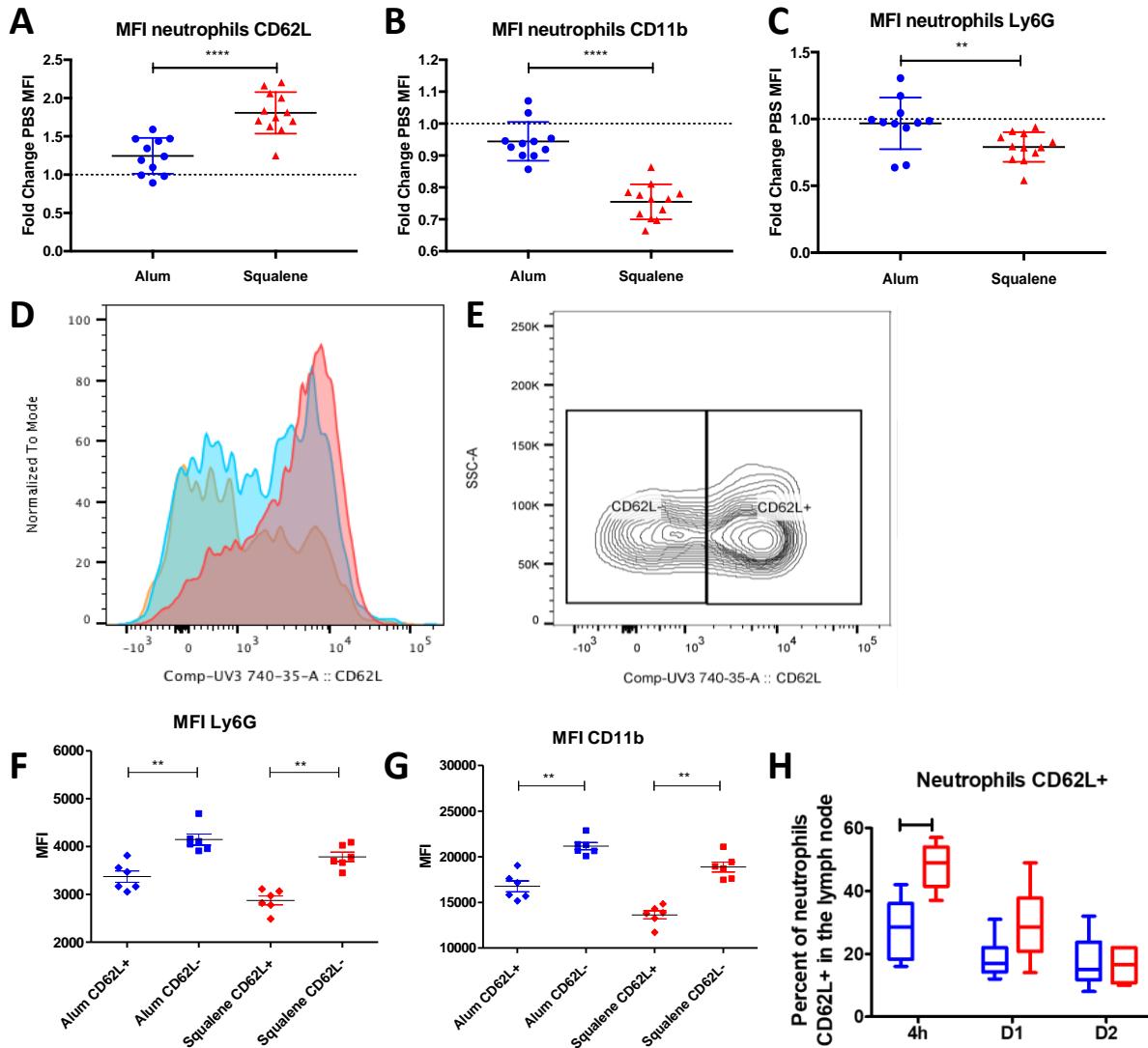


Figure 15 : Caractérisation phénotypique des neutrophiles dans le GLD

A. Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MFI) par rapport à la MFI après injection de PBS (fold change), **B.** histogramme de l'expression du marqueur CD62L, **C.** populations CD62L- et CD62L+ et **D.** MFI des populations CD62L+ ou CD62L- des neutrophiles (CD45+ Ly6G+ Ly6C+ CD11b+) dans les ganglions drainants 4h après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé avec l'Alum (bleu) ou Squalene (rouge), ou injection de PBS (orange). **E.** Pourcentage de neutrophiles CD62L+ dans le ganglion drainant ($n = 3$ souris * 2 organes/condition) quantifié par cytométrie en flux 4h, 1 jour D1 and 2 jours D2 après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé avec l'Alum (bleu) ou Squalene (rouge). Analyses statistiques entre les différentes formulations : test Mann Whitney U. Significativité statistique indiquée par : ** $p < 0.01$.

Dans la littérature, il est décrit que l'activation des neutrophiles se traduit phénotypiquement par la diminution de l'expression de CD62L. Le rôle de Ly6G reste mal connu.

Une des fonctions des neutrophiles est la phagocytose de pathogènes extracellulaires. Nous avons fait l'hypothèse que l'antigène pouvait être internalisé différemment par les cellules de la réponse innée, et notamment les neutrophiles et les monocytes inflammatoires. Afin d'évaluer la capacité de capture de particules extracellulaire par ces cellules, nous avons ajouté des micro billes de 200nm fluorescentes (dont l'émission est détectée dans le canal FITC) aux formulations vaccinales et avons évalué le taux de billes capturé par les cellules au niveau du site d'injection.

On peut voir que dans les premières heures qui suivent l'immunisation la formulation Squalene induit un plus grand pourcentage de neutrophiles billes+ dans le muscle que la formulation Alum (Figure 16A). La tendance s'inverse ensuite. Tandis que le pourcentage de neutrophiles positifs pour les billes reste relativement constant les premiers jours après immunisation avec la formulation Squalene, ce pourcentage augmente au cours du temps avec la formulation Alum (Figure 16A). La différence de pourcentage de neutrophiles positif pour les billes en condition Squalene ou Alum devient alors très significative deux jours après immunisation avec près de 65% des neutrophiles positifs pour les billes avec la formulation Alum contre 40% pour la formulation Squalene (Figure 16A). Les mêmes tendances, bien que moins marquées, sont observées pour les monocytes inflammatoires (Figure 16B).

Cependant, ces résultats ne montrent que la capacité des cellules à possiblement phagocytter l'antigène. Si on rapporte ces pourcentages au nombre de cellules présentes dans les organes, bien que la capacité des neutrophiles à phagocytter semble moins importante avec la formulation Squalene que Alum, il y a toujours plus de neutrophiles billes+ un jour après immunisation avec la formulation Squalene (Figure 16C). De même pour les monocytes inflammatoires un jour après immunisation, la différence de pourcentage de monocytes billes+ est compensée par leur plus grand nombre après immunisation avec la formulation Squalene par rapport à l'Alum (Figure 16D).

D'un côté, la capacité des neutrophiles et des monocytes inflammatoires à internaliser des billes de 200nm mimant une particule extracellulaire telle que notre candidat vaccin au site d'injection ainsi que leur nombre augmentent au cours du temps pendant les premiers jours

après injection de la formulation Alum. D'un autre côté, la formulation Squalene semble induire une internalisation plus efficace les premières heures après immunisation puis leur nombre leur permet de surpasser la capacité totale d'internalisation quantifiée avec la formulation Alum. De même que pour la formulation Alum, le nombre de monocytes qui ont internalisé des particules contenant des billes augmente pendant les premières heures et les premiers jours qui suivent l'immunisation avec la formulation Squalene mais leur capacité d'internalisation augmente avec un délai d'un jour supplémentaire.

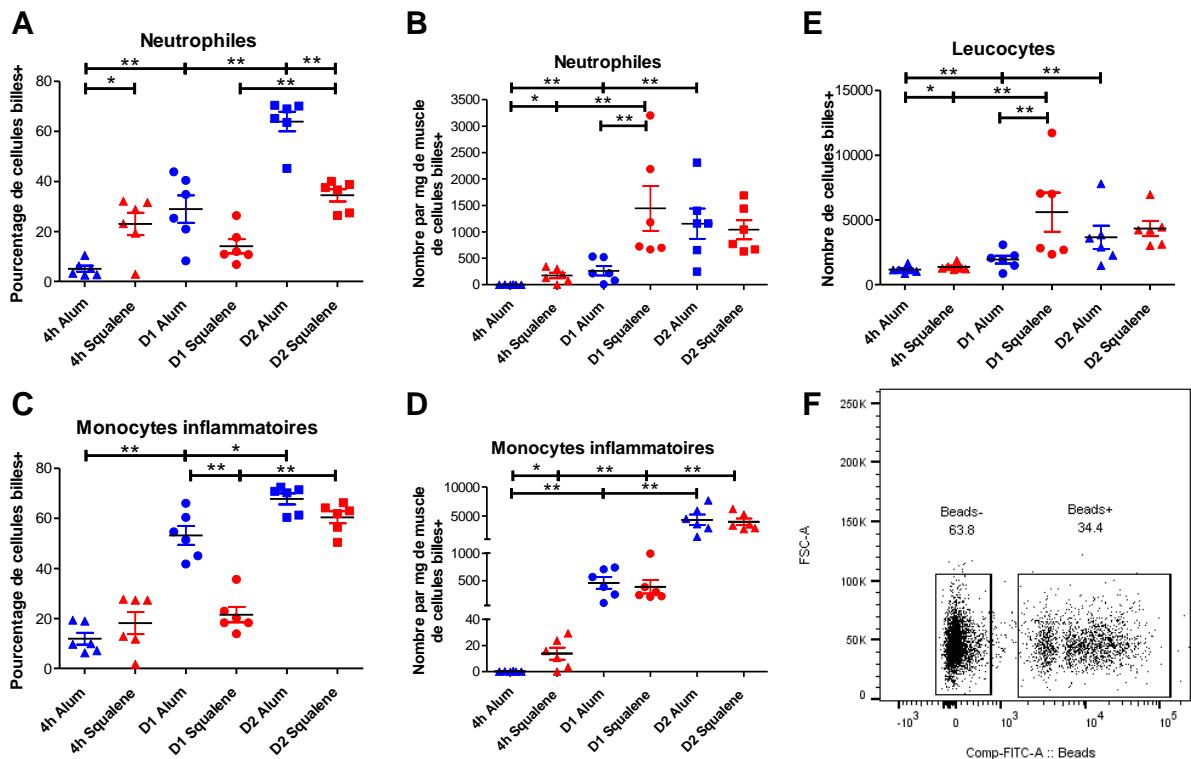


Figure 16 : Capacité d'absorption des neutrophiles et des monocytes inflammatoires

A.-D. Pourcentage (A. et C.) et nombre par mg de muscle (B. et D.) de neutrophiles (CD45+ Ly6G+ Ly6C+ CD11b+) (A.-B.) et de monocytes inflammatoires (CD45+ Ly6G- Ly6Chi CD11b+ CMH II-) (C.-D.) dans le muscle et nombre absolu de leucocytes (CD45+) dans le ganglion drainant (E.) le muscle défini comme billes+ (dot plot F.) quantifié par cytométrie en flux 4h, 1 jour D1 and 2 jours D2 ($n = 3$ souris * 2 organes/condition) après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH additionné de billes-FITC (1/200) formulé avec l'Alum (bleue) ou Squalene (rouge). Analyses statistiques entre les différentes formulations : test Mann Whitney U. Significativité statistique indiquée par : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Nous avons donc mis en évidence un contexte inflammatoire différent après immunisation avec les deux adjuvants Alum et Squalene avec des différences de recrutement, d'activation

et de fonction. Nous avons donc essayé d'identifier le rôle des neutrophiles dans la réponse humorale. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de déplétion des neutrophiles au moment de l'immunisation. Nous avons utilisé un protocole d'injection IP de l'anticorps monoclonal 1A8 ciblant spécifiquement les cellules exprimant Ly6G, et donc les neutrophiles un jour avant et un jour après immunisation. Dans un premier temps nous avons vérifié l'efficacité de la déplétion de cette population dans le sang et au niveau des GLD (Figure 17A-B). Ce protocole permet une totale déplétion des neutrophiles dans le sang jusqu'au moins 48 heures après immunisation et à 4 heures dans le ganglion drainant, au pic de recrutement des neutrophiles avec la formulation Squalene (Figure 14G).

Sans déplétion des neutrophiles, les IgG spécifiques du peptide W614A-3S sont retrouvés en quantité équivalente dans le sérum des souris après l'immunisation avec le vaccin candidat W614A-3S-KLH formulé en Alum ou en Squalene (Figure 17C). Toutefois, après déplétion des neutrophiles, on retrouve plus d'IgG anti-W614A-3S dans le sérum dans les souris immunisées avec la formulation Squalene que Alum (Figure 17C). L'affinité de ces IgG pour leur antigène spécifique a été mesurée par un test d'avidité. Nous pouvons constater que la déplétion des neutrophiles n'a pas d'impact sur l'affinité des IgG induits et qu'avec ou sans déplétion des neutrophiles, les IgG sont plus affines après immunisation avec la formulation Squalene qu'après immunisation avec la formulation Alum (Figure 17D).

La formulation alum induit une même quantité d'IgG spécifiques que la formulation Squalene mais ces IgG sont de plus faible affinité. L'affinité des IgG spécifiques induite par le vaccin candidat semble être associée à l'induction d'un plus grand nombre de LB du CG après immunisation avec la formulation Squalene (données non présentées). L'ensemble de nos résultats suggèrent que les neutrophiles ne semblent pas avoir d'impact particulier sur l'induction d'IgG spécifiques du peptide W614A-3S de forte affinité en réponse à une immunisation formulée avec l'adjuvant Squalene. Cependant, les neutrophiles pourraient être impliqués dans l'induction d'IgG spécifiques du peptide W614A-3S en réponse à une immunisation formulée avec l'Alum bien que ces anticorps soient de plus faible affinité pour l'antigène, phénomène indépendant de la quantité de LB du CG.

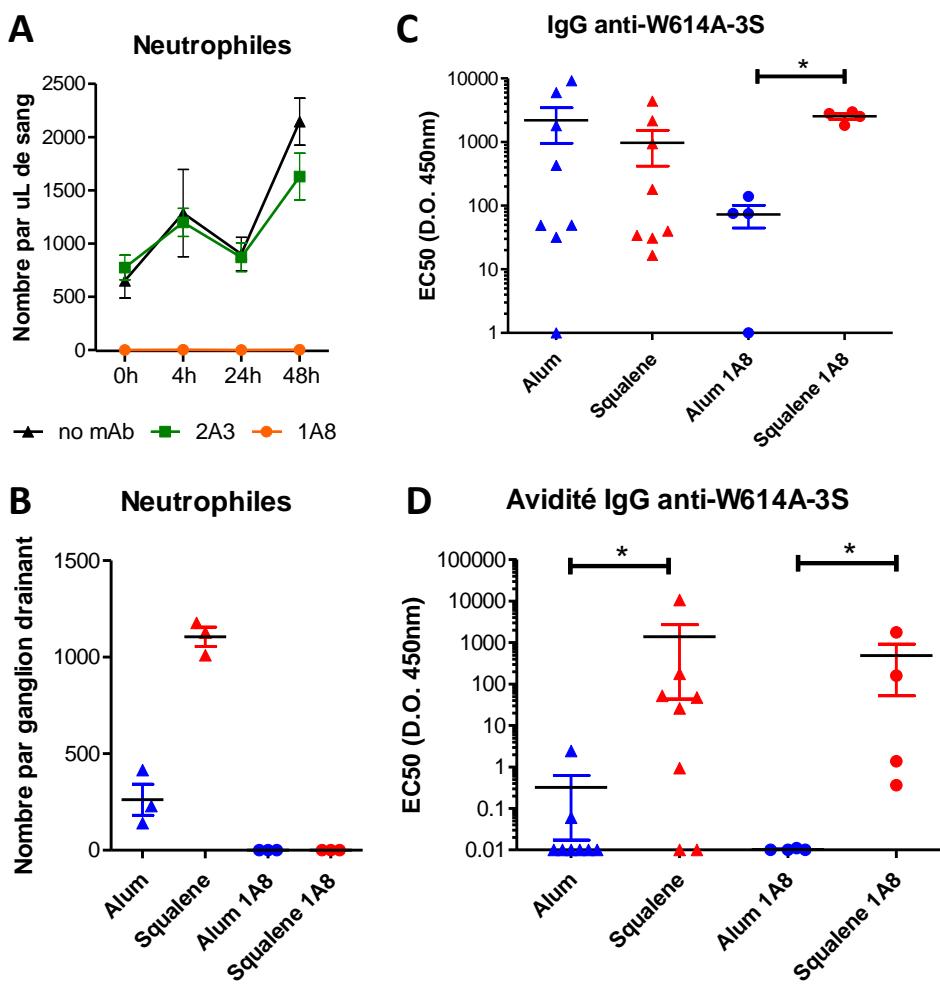


Figure 17 : Impact des neutrophiles sur la réponse humorale

A. Quantification des neutrophiles dans le sang ($n = 3$ souris/condition) après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé en Squalene et déplétion des neutrophiles avec une injection I.P. de l'anticorps monoclonal 1A8 (orange) ou après injection de l'isotype contrôle 2A3 (vert) ou après injection d'aucun anticorps monoclonal (noir). **B.** Quantification des neutrophiles dans le ganglion drainant ($n = 3$ souris/condition) 4 heures après immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé en Alum (bleu) ou en Squalene (rouge) déplétion des neutrophiles avec une injection I.P. de l'anticorps monoclonal 1A8 (triangles) ou après injection d'aucun anticorps monoclonal (ronds). **C.** Titration des IgG anti-W614A-3S et **D.** de leur avidité par ELISA après la quatrième immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé en Alum (bleue) ou Squalene (rouge) ($n = 4-8$ souris /condition). Les titrations ou les avidités trop faibles pour être détectées par ELISA ont été fixées respectivement à 1 et 0,01. **E.** Nombre absolu de LB CG (CD4- CD8- B220+ IgD- CD95+ GL7+) par ganglion drainant quantifié par cytométrie en flux une semaine après la deuxième immunisation i.m. avec W614A-3S-KLH formulé en Alum (bleue) ou Squalene (rouge) ($n = 3$ souris * 2 organes/condition). Analyses statistiques entre les différentes formulations : test Mann Whitney U. Significativité statistique indiquée par : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Discussion – Conclusion

Le VIH est capable d'échapper au système immunitaire grâce au fort taux de mutation génétique, sa capacité de recombinaison entre différentes souches et la conformation de son unique protéine de surface Env. Depuis le début des essais de vaccination du XXIème siècle, aucun vaccin ne s'est montré capable d'induire une protection efficace contre le VIH. La présence d'anticorps dirigés contre un petit nombre de régions conservées de Env capables de neutraliser un large spectre de souches de VIH a été observée chez très peu de patients infectés par le VIH mais reste une piste attrayante pour contrôler l'infection VIH et a aidé au développement d'immunogènes protéiques vaccinaux.

Les vaccins sous-unitaires ont fait leurs preuves depuis longtemps mais ils nécessitent l'ajout d'adjuvants pour augmenter leur immunogénicité. Bien qu'on sache que les adjuvants vaccinaux aident à engendrer des réponses immunitaires rapides, puissantes et durables, contre les antigènes auxquels ils sont associés, le manque de compréhension du mécanisme d'action immunologique des adjuvants a limité le développement de vaccins efficaces.

La formulation d'un vaccin contre la grippe pour les personnes âgées avec MF-59, ou comme nommé ci-dessous, le Squalene, a permis d'obtenir des résultats de neutralisation à plus large spectre que l'Alum (Galli et al., 2009; Zheng et al., 2012). De plus, la formulation d'un vaccin VIH contenant la protéine monomérique de gp120 d'Env avec un adjuvant Squalene induit une plus forte capacité de neutralisation de souche de VIH hétérologue qu'avec un adjuvant Alum (Liang et al., 2017). Ces résultats semblent indiquer que le MF-59 est un adjuvant prometteur pour la vaccination, contre le VIH par exemple, qui permettrait d'induire une réponse capable de neutraliser une part importante de ses nombreux variants.

Nous avons proposé un vaccin peptidique contre le VIH à base d'un peptide très conservé de la gp41 (W614A-3S) couplé à une protéine porteuse (CRM197) et formulé en Squalene, une émulsion à base de squalène, comme nouveau candidat vaccin capable d'induire des anticorps neutralisants un large éventail de souches du VIH (article 1 en cours de publication). Cependant les mécanismes menant à la production de ce type d'anticorps restent méconnus et difficiles à reproduire. En effet, l'antigène doit certes être une partie conservée entre les souches de VIH et impliqué dans le processus d'infection mais les étapes

de maturations et de sélections spécifiques des LB sont également essentielles à la génération d'anticorps neutralisants.

La compréhension du mode d'action des adjuvants pourrait ainsi permettre le développement de vaccins efficaces. De nombreuses études comparent deux adjuvants licenciés pour un usage chez l'Homme, Alum et MF-59 (Squalene) pour élucider leurs mécanismes d'action mais leur compréhension reste incomplète. Le grand nombre de molécules, de populations cellulaires, de compartiments mis en jeux dans les réponses immunitaires sont intriqués *in vivo* et complexifient l'étude des mécanismes *in vitro*.

Maturation des LB

Bien que les mécanismes spécifiques de l'induction d'AcN soient méconnus, il a été observé que le niveau de MHS des AcN est supérieur à celui des anticorps non-neutralisants chez les adultes. De plus, les AcN ont tendance à avoir CDR particulièrement longues et notamment CDRH3 (Kwong and Mascola, 2012; Mouquet and Nussenzweig, 2012). Ces données suggèrent une maturation plus importante des LB, la seule population apte à produire des anticorps lors de la réponse humorale. La maturation et la sélection des LB se déroulent au sein des CG et permettent d'obtenir la production d'anticorps de plus forte affinité pour l'antigène.

Nous avons montré que la formulation du vaccin candidat W614A-3S avec du Squalene induit des AcN ainsi qu'un plus grand nombre de LB du CG par rapport à une formulation Alum qui n'induit que des anticorps non-neutralisants. De plus, tout comme le montre l'équipe de Bertholet (Lofano et al., 2015) dans un modèle de vaccination contre *Staphylococcus aureus*, dans notre modèle de vaccination VIH, la formulation Squalene induit un plus grand nombre de LB du CG spécifiques du peptide W614A-3S après immunisation (article 1 en cours de publication) ainsi que de Tfh (données non présentées). Cependant, dans d'autres modèles tels que dans les troubles liés à l'utilisation d'opioïdes, un vaccin peptidique couplé à KLH formulé avec de l'Alum s'est montré plus efficace pour induire une expansion précoce des LB spécifiques de l'antigène. A noter que la quantification a été réalisée à des temps différents des études précédemment citées, c'est-à-dire non pas 7 jours mais 14 jours après immunisation (Robinson et al., 2019). Il faut donc garder à l'esprit que le modèle et la cinétique sont très importants dans l'étude quantitative de l'induction par la vaccination des LB du CG spécifiques.

MF-59 induit la persistance des LB du CG par rapport à l’Alum (Lofano et al., 2015). Ce maintien des LB dans les CG augmente potentiellement leur temps de maturation et de différenciation. Ce temps supplémentaire de maturation peut expliquer la différence de qualité des anticorps obtenus avec la formulation Squalene (AcN) et Alum (anticorps non-neutralisants) observée dans notre modèle. Nous avons montré que les formulations du candidat vaccin en Squalene ou en Alum induisent différents stades de différenciation de populations de LB dans le GLD par une approche de RT-qPCR à l’échelle unicellulaire. La proportion de LB du CG (exprimant les gènes Bcl6, Fas, Efnb1 et Id3) est significativement plus élevée lorsque le vaccin W614A-3S est formulé en Squalene alors que les précurseurs des plasmocytes (exprimant les gènes Prdm1, Irf4, Cd69 et Myc) sont significativement plus élevés après la formulation Alum. Les LB spécifique de W614A-3S induits par les deux formulations du candidat vaccin ont différents profils d’expression génique suggérant une activation différente. Des études complémentaires doivent être réalisées pour comprendre le rôle et les mécanismes impliqués dans cette différence de profil des LB.

Caractéristiques des anticorps

Les troisièmes régions déterminant la complémentarité des régions variables des chaînes lourdes (CDRH3) confèrent la spécificité aux anticorps (Johnson and Wu, 1998). Les CDRH3 chez les Hommes peuvent faire de 2 à 30 résidus avec une moyenne de 13 résidus tandis que chez la souris ils font de 1 à 19 résidus avec une moyenne de 10 résidus pour des anticorps dirigés contre des antigènes protéiques (Collis et al., 2003). Les anticorps humains dirigés contre les agents pathogènes viraux semblent avoir des régions CDRH3 plus longues que la moyenne (Collis et al., 2003). L’étude par analyse cristallographiques d’anticorps monoclonaux (Burton et al., 2005) révèle une adaptation de leur structure pour atteindre les sites de neutralisation du virus. En effet, les sites d’interaction virus-cellule sont généralement en retrait sur les agents pathogènes tel que le VIH et ils pourraient être reconnus par des élongations des CDR. Une majorité des AcN sont dirigés contre la gp120. Par exemple le CDRH3 des AcN monoclonaux humains b12 a une longueur de 18 résidus, une longueur de 19 résidus pour l’AcN 17b, une longueur de 22 résidus pour l’AcN 2F5 et également une longueur de 22 résidus pour l’AcN X5 (Saphire et al., 2001). La longueur de cette région semble refléter un processus de sélection intense et semble importante pour l’activité de neutralisation (Kwong and Mascola, 2012).

Notre analyse de la séquence des CDR3 dans les LB spécifiques du peptide W614A-3S a montré que les proportions de ces cellules avec une longueur différente de CDRH3 sont relativement similaires dans les conditions d'Alum et Squalene. Nous souhaitions identifier des séquences associées à la neutralisation mais nous avons produit trop peu de clones des IgG1 monoclonaux recombinants spécifiques de W614A-3S pour arriver à obtenir au moins un AcN. Précédemment, parmi plus de 1000 hybridomes obtenus après immunisation de souris avec le peptide W614A-3S formulé dans de l'IFA, un autre adjuvant permettant l'obtention d'AcN mais non utilisable chez l'Homme, un unique clone F8 a été identifié comme AcN (Dorgham et al., 2019) Ces données témoignent de la très faible fréquence des AcN et du défi technique à relever. Malgré ces données décevantes, l'élongation des CDR3 étant permise par le processus d'HMS, nous avons regardé plus en détails les séquences des CDR3 des BCR générés par la formulation Squalene et ces séquences se sont révélées distinctes de celles générées par la formulation Alum ce qui valide la dichotomie des réponses induites par ces deux adjuvants.

Effet dépôt

Le mécanisme d'action le plus ancien et le plus largement reconnu des adjuvants est l'effet dépôt, un mécanisme de rétention de l'antigène au site d'injection pour une stimulation continue du système immunitaire pour la production d'anticorps.

Pour MF-59 l'effet dépôt est modéré car après immunisation, le MF59 est distribué et éliminé de manière indépendante de l'antigène avec une demi-vie de 42 h dans le tissu musculaire sans former de dépôt au site d'injection (Dupuis et al., 1999; Ott et al., 1995). Dans ce délai, les cellules de la réponse innée sont recrutées au site d'injection et activées par la production de cytokines et de chimiokines.

L'Alum augmente l'absorption et la durée de présentation des antigènes par les DC (Flach et al., 2011; Morefield et al., 2005). Cependant, le rôle d'un effet dépôt, supposé améliorer l'absorption et la présentation de l'antigène par les CPA par Glenny (Glenny et al., 1926) n'est pas démontré par les travaux de Marrack et ses collaborateurs (Marrack et al., 2009) voire invalidé par les travaux de Gregorio et ses collaborateurs (Gregorio et al., 2008). En effet, l'ablation du site d'injection 2h après immunisation avec une formulation en Alum n'a pas montré d'effet sur la réponse humorale ou réponse cellulaire (Hutchison et al., 2012).

L'impact des formulations Alum et Squalene ne se résume donc probablement pas à un simple effet dépôt.

A noter que dans notre étude, le peptide a été couplé tour à tour avec une protéine carrier CRM ou KLH. Ces deux protéines ont des tailles très différentes : CRM fait environ 60 kDa tandis que KLH est une grosse protéine d'environ 350-400 kDa. L'effet dépôt des adjuvants est donc probablement potentialisé par la formulation du peptide couplé à KLH avec l'Alum notamment. D'autres études ont utilisé des peptides couplés à KLH et formulé en Alum (Robinson et al., 2019). Certes le pourcentage d'Alum utilisé est moins important que dans notre étude (2% contre 10% dans nos expériences) mais ils ont observé des titres d'IgG sériques spécifiques significativement plus élevés chez les souris immunisées avec la formulation Alum par rapport à la formulation Squalene (MF59). Ces données suggèrent que la formulation d'un peptide couplé à KLH avec de l'Alum n'empêche pas l'induction d'une réponse humorale.

Recrutement cellulaire au site d'injection

Plus récemment, les études des mécanismes d'action des adjuvants se sont intéressées aux processus inflammatoires locaux et au recrutement des cellules de la réponse immunitaire innée au site d'injection. Ces cellules peuvent ensuite transporter l'antigène jusqu'au GLD pour induire les réponses adaptatives spécifiques de cet antigène, en tant que CPA, ou comme simple véhicule intermédiaire ou encore pour créer un environnement inflammatoire propice à l'activation/différenciation/maturation/sélection des lymphocytes. En fonction de l'adjuvant, les cellules recrutées peuvent ainsi être diverses et avoir des impacts différents sur la quantité et la qualité de la réponse humorale et/ou cellulaire.

La majorité des vaccins sont injectés par voie IM donc les études qui portent sur le muscle sont les plus représentatives. Par cytométrie en flux, nous avons montré que le Squalene induit un recrutement plus important que l'Alum de cellules CD11b+ tels que les monocytes inflammatoires ou les neutrophiles au site d'injection 1 jour après immunisation dans le muscle. Ces résultats sont en accord avec ceux de Calabro et al. (2011) ainsi que ceux de Mosca et al. (2008) qui montrent l'afflux important de cellules CD11b+ avec MF-59 également 1 jour après immunisation dans le muscle par microscopie confocale.

Nos résultats de quantification par cytométrie en flux des neutrophiles et des monocytes inflammatoires permettent de détecter que dès 4 heures, ces cellules sont déjà beaucoup

plus nombreuses dans la condition Squalene que dans la condition Alum. Calabro et al. (2011) ont étudié en détail le recrutement de cellules immunitaires dans le muscle après injection de MF-59. Tout comme nous, ils ont observé une plus forte augmentation du nombre de neutrophiles, les premières cellules recrutées dans le muscle dès une heure après injection de MF-59 par rapport à l'Alum, suivie par l'augmentation du nombre de monocytes inflammatoires quelques heures plus tard.

D'après l'analyse de l'expression génique au site d'injection de Mosca et al. (2008) et la quantification des cytokines/chimiokines sanguines par Calabro et al. (2011), MF-59 s'est avéré être un stimulus plus puissant que l'Alum. L'immunisation avec la formulation MF-59 induit l'expression d'une gamme de gènes, de cytokines, de chimiokines et de récepteurs aux interleukines plus diverses dont des gènes liés à la réponse IFN de type I. Le stimulus plus puissant du MF-59 pourrait donc expliquer la différence de cinétique et de quantité de cellules recrutées au site d'injection notamment grâce à CCR2 et ses ligands CCL2, CCL7 et CCL8, impliquées dans l'infiltration des monocytes (Dupuis et al., 2001; Mosca et al., 2008; Seubert et al., 2008).

Les deux adjuvants provoquent une infiltration de cellules immunitaires au site d'injection pour créer un environnement inflammatoire au site d'injection, mais MF-59 induit un plus fort recrutement de neutrophiles (Goto and Akama, 1982). De plus, nous avons également observé un plus grand nombre de macrophages au site d'injection 1 jour après immunisation avec le Squalene qu'avec l'Alum (donnée non présentée). Les macrophages peuvent dériver des monocytes recrutés. On peut donc faire l'hypothèse que l'adjuvant Squalene peut, en plus d'induire un plus fort recrutement, influencer la différenciation des monocytes en macrophages tandis que les monocytes recrutés après injection d'Alum se différencient en DC inflammatoires exprimant des niveaux élevés de CMH II (Kool et al., 2008).

L'adjuvant MF-59 induit l'expression précoce de cytokines par les cellules hématopoïétiques qui pourraient contribuer à l'activation des cellules du muscle. Les résultats de Mosca et al. (2008) suggèrent que MF-59, contrairement à l'Alum, cible et active directement les fibres musculaires. Ces fibres peuvent participer activement aux réactions immunitaires locales en exprimant des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines ou des molécules d'adhésion qui participent au recrutement de cellules immunitaires et à l'activation les DC résidentes dans les tissus et les DC nouvellement recrutées.

Prise en charge de l'antigène

Les DC sont les seules cellules capables de présenter l'antigène aux LT naïfs pour les activer et induire une réponse humorale dépendante des Tfh. Les adjuvants peuvent promouvoir la prise en charge de l'antigène par les DC mais ces cellules ne sont pas directement activées ni par le MF-59 ni par l'Alum *in vitro* donc l'action de ces adjuvants doit se situer en amont des DC (Dupuis et al., 1998).

Nous avons donc fait l'hypothèse que les monocytes et les neutrophiles, au-delà d'être recrutés en quantités différentes au site d'injection, de par la différence de stimulus observées au site d'injection, peuvent aider à initier des réponses immunitaires adaptatives par différentes voies. Par exemple, par le transfert de l'antigène au GLD et l'activation des cellules de la réponse adaptative telles que les DC ou les lymphocytes.

Pour suivre l'absorption de l'antigène, Calabro et al. (2011) ont utilisé une protéine OVA couplée à un fluorochrome formulé dans du MF-59 fluorescent tandis que nous avons utilisé des billes fluorescentes formulées dans du Squalene. Ces deux modèles ont mis en évidence que l'adjuvant favorise l'absorption de l'antigène par les cellules CD11b+ recrutées tels que les monocytes inflammatoires et les neutrophiles. Calabro et al. (2011) ont montré que les différentes cellules recrutées contribuent équitablement à l'absorption de l'antigène. Mais dans leur étude ils présentent uniquement leurs résultats avec la formulation MF-59. De notre côté, nous avons comparé l'absorption d'antigène suite à l'injection d'Alum ou de Squalene par l'intermédiaire de billes fluorescentes et observé qu'un plus grand pourcentage de monocytes inflammatoires et de neutrophiles capturent les billes avec la formulation Alum qu'avec la formulation Squalene. Cette différence est compensée par le plus grand nombre de cellules présentes dans le muscle avec la formulation Squalene et celle-ci semble plus efficace pour activer la phagocytose dans les premières heures après immunisation.

Transport de l'antigène vers les GLD

Pour identifier les types de cellules pouvant servir de véhicules aux antigènes jusqu'au GLD, Calabro et al. (2011) ont analysé la présence de cellules positives pour l'antigène dans les GLD. En plus des DC, ils y ont trouvé des neutrophiles et des monocytes positifs à l'antigène quelques heures après immunisation avec la formulation MF-59 mais pas avec la formulation Alum. Mais il est difficile d'évaluer le transport de l'antigène directement par les cellules. Ces

techniques ne permettent pas de conclure sur le mécanisme d'internalisation mais sur la quantification de la capture de particules. En effet les cellules positives pour l'antigène ou l'adjuvant détecté dans les GLD peuvent résulter d'une capture au niveau du site d'immunisation par des cellules qui ont ensuite migré dans les GLD. Il est également possible que l'antigène et/ou l'adjuvant puissent avoir migré librement jusqu'au ganglion où des cellules phagocytaires déjà présentes dans le GLD comme les DC ou les neutrophiles peuvent le prendre en charge. Dans notre étude nous avons simplement quantifié un plus grand nombre de cellules positives à l'antigène après immunisation avec la formulation Squalene sans pour autant pouvoir déterminer le moyen de transport de cet antigène. Des études complémentaires à l'aide de photo-conversion du site d'injection à différents temps pour suivre les cellules jusqu'au GLD pourraient répondre à la question du transport de l'antigène.

Les neutrophiles et les monocytes peuvent absorber l'antigène et/ou l'adjuvant et se diriger vers les GLD pour aider à l'initiation de la réponse humorale. Il a notamment été montré *in vivo* que les neutrophiles, comme les DC ou les monocytes inflammatoires, migrent par les vaisseaux lymphatiques afférents vers les GLD et peuvent transporter des antigènes (Abadie et al., 2005; Bonneau et al., 2006). Dans les GLD, les antigènes peuvent ensuite être transmis aux CPA qui peuvent également être activés par les neutrophiles (Megiovanni et al., 2006).

Bien que les neutrophiles ne soient pas des CPA, des études ont montré que dans des conditions inflammatoires, des neutrophiles murins expriment le CMH II et affirment qu'ils pourraient présenter eux-mêmes certains antigènes (Culshaw et al., 2008). D'autres équipes ont également montré que l'expression des molécules de CMH II peut être induite à la surface des neutrophiles *in vitro* et *in vivo* et qu'ils peuvent présenter des antigènes directement aux LT (Radsak et al., 2000). Peu d'études démontrent les capacités de CPA des neutrophiles, et cette possibilité est un sujet très controversé dans le monde scientifique.

Activation des neutrophiles

Il est possible que les neutrophiles puissent être activés différemment en fonction de l'adjuvant injecté et attirer ou activer à leur tour d'autres types cellulaires telles que les DC.

Dans la littérature, il est décrit que l'activation des neutrophiles se traduit phénotypiquement par la diminution de l'expression de CD62L, l'augmentation de l'expression de Mac1 (CD11b-CD18) (Molad et al., 1994). Les neutrophiles ainsi activés différemment peuvent influencer la réponse adaptative par plusieurs biais.

Pendant longtemps, on a cru que les neutrophiles participaient exclusivement aux réponses immunitaires innées en périphérie. Cependant, les travaux de Cerutti et ses collaborateurs ont montré que les neutrophiles peuvent influencer la réponse humorale en modulant la production des anticorps par les LB. Ils ont identifié une sous-population de neutrophiles humains issus de la rate capable de produire BAFF (ou BLyS) qui jouent un rôle dans la prolifération et la différentiation des LB. Les études de Scapini ont montré que cette cytokine stockée dans les granules des neutrophiles et ancrée à la membrane plasmique, peut être libérée sous forme soluble active après stimulation des neutrophiles par l'IFNgamma (Scapini et al., 2005, 2008). La sécrétion de BAFF par les neutrophiles accélère la différenciation des LB et augmente leur production d'anticorps (Cerutti et al., 2013; Puga et al., 2012). D'autres équipes ont également mis en évidence la production de BAFF par les neutrophiles et son implication dans la différenciation et la survie des LB, suggérant un rôle important des neutrophiles dans l'induction d'une réponse humorale efficace.

Les adjuvants peuvent provoquer des lésions tissulaires locales et la mort cellulaire au site d'injection qui transmet des signaux de dommage/danger au système immunitaire. Ces signaux de dommage déclenchent une activation non spécifique du système immunitaire inné, stimulant par la suite l'immunité adaptative (Shi et al., 2003). Pour les neutrophiles, une des réponses à ces signaux peut être une réponse oxydative avec la libération de formes réactives de l'oxygène (FRO). Dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde déficient en ROS, une formation accrue du CG a été observée mais sans mutations somatiques des LB auto-réactifs (Khmaladze et al., 2015). De plus la production de FRO par les neutrophiles peuvent supprimer la prolifération des lymphocytes. Les FRO semblent donc jouer un rôle dans la maturation des LB. Des résultats préliminaires au sein de l'équipe semblent indiquer que le Squalène induit une plus grande libération de FRO après stimulation *in vitro* que l'Alum. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si la production de FRO par les neutrophiles après immunisation avec la formulation Squalène impacte l'induction du CG et la maturation des LB pour la production d'AcN dans notre modèle.

Impact de la déplétion des neutrophiles sur la réponse humorale

Au vu de nos résultats et de la littérature, nous nous sommes demandé si les neutrophiles sont nécessaires pour l'efficacité de notre candidat vaccin VIH formulé avec l'adjuvant Squalene. En effet, différents travaux récents rapportent la découverte que les neutrophiles

peuvent servir de véhicules aux antigènes par les vaisseaux lymphatiques dans certaines conditions (Abadie et al., 2005).

La déplétion spécifique des neutrophiles grâce à un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule Ly6G est efficace pour prévenir le recrutement de ces cellules au site d'immunisation (Calabro et al., 2011) et leur migration dans les GLD. En accord avec la littérature (Calabro et al., 2011), nos résultats montrent que la déplétion des neutrophiles n'annule pas l'impact du Squalene sur les réponses immunitaires spécifiques à l'antigène comme l'induction de CG ou le titre en anticorps. Malgré leur nombre élevé, leur cinétique de recrutement rapide et leur état d'activation, la présence de neutrophiles aux temps précoces après immunisation ne semble pas essentielle pour l'induction d'anticorps spécifiques de l'antigène. Il nous reste à vérifier si les neutrophiles jouent un rôle dans la qualité de la réponse humorale et notamment dans l'induction d'AcN. Nous n'avons à ce jour pas pu conclure sur l'impact de la déplétion des neutrophiles sur la qualité de la réponse humorale car nous n'avons pas obtenus les résultats sur la capacité de neutralisation des anticorps induits suite à l'immunisation en cas de déplétion des neutrophiles.

D'autres modèles ont étudié l'impact de la déplétion des neutrophiles sur la réponse humorale notamment dans des modèles de lupus et ont obtenu des résultats contradictoires. Dans un premier modèle de lupus, la déplétion des neutrophiles induit une diminution de la fréquence des LB du CG ainsi que des CG plus petits et une quantité IgG diminuée chez les souris malades et traitées (Coquery et al., 2014) alors que dans un second modèle de lupus, la déplétion des neutrophiles augmente le nombre de LB du CG et de Tfh. Toujours dans le cadre de l'étude du lupus, les neutrophiles isolés précocement à partir de rate de souris inhibent *in vitro* la différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps (Trigunaite et al., 2013).

Ces résultats suggèrent que selon les conditions ou les modèles étudiés, une même population peut avoir des impacts différents sur la quantité et la qualité de la réponse humorale. Ils suggèrent également que les multiples types de cellules recrutées ont des fonctions redondantes et peuvent se compenser quand l'un est absent. Dans notre cas, il semble que les neutrophiles ne soient pas une population indispensable pour initier la mise en place d'une réponse humorale. La complexité de l'environnement au site d'injection et la redondance du système immunitaire laisse difficilement penser qu'une seule population serait responsable de la qualité de la réponse humorale.

Conclusion

Pour conclure, le vaccin candidat W614A-3S a confirmé le pouvoir des AcN dirigés contre une cible très conservée entre les souches de VIH pour le développement d'un vaccin efficace. Par ailleurs, après avoir passé avec succès les différentes étapes des études précliniques, ce vaccin candidat fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 0 pour confirmer sa capacité à induire des AcN chez l'Homme.

Ce modèle a également participé à renforcer et étendre les connaissances concernant les différents impacts d'une formulation Squalene ou Alum sur les réponses innées et adaptatives. Nous avons mis en évidence des différences majeures au niveau de l'inflammation locale, de l'état d'activation des cellules dans les GLD ou de la différenciation des B spécifique entre les deux formulation. Notamment, nous avons montré le recrutement intense et précoce de neutrophiles, et une forte réaction du CG en réponse à la formulation Squalene qui induit la production d'AcN. Ainsi nous avons confirmé l'efficacité de l'adjuvant Squalene dans l'induction d'une réponse neutralisante à large spectre et apporté des éléments de réponse sur les mécanismes d'induction des AcN au niveau de la caractérisation des

LB.

Annexe 1



Review

Peptide-Based Vaccination for Antibody Responses Against HIV

Behazine Combadière *, Manon Beaujean, Chloé Chaudesaigues and Vincent Vieillard

Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06, INSERM, U1135, CNRS, ERL 8255, Center of Immunology and Infectious Diseases (CIMI-Paris), 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

* Correspondence: behazine.combadiere@inserm.fr; Tel.: +33-140-77-988

Received: 16 July 2019; Accepted: 30 August 2019; Published: 2 September 2019



Abstract: HIV-1 is responsible for a global pandemic of 35 million people and continues to spread at a rate of >2 million new infections/year. It is widely acknowledged that a protective vaccine would be the most effective means to reduce HIV-1 spread and ultimately eliminate the pandemic, whereas a therapeutic vaccine might help to mitigate the clinical course of the disease and to contribute to virus eradication strategies. However, despite more than 30 years of research, we do not have a vaccine capable of protecting against HIV-1 infection or impacting on disease progression. This, in part, denotes the challenge of identifying immunogens and vaccine modalities with a reduced risk of failure in late stage development. However, progress has been made in epitope identification for the induction of broadly neutralizing antibodies. Thus, peptide-based vaccination has become one of the challenges of this decade. While some researchers reconstitute envelope protein conformation and stabilization to conserve the epitope targeted by neutralizing antibodies, others have developed strategies based on peptide-carrier vaccines with a similar goal. Here, we will review the major peptide-carrier based approaches in the vaccine field and their application and recent development in the HIV-1 field.

Keywords: peptide-conjugate; HIV-1; neutralizing antibodies; vaccination; adjuvants

1. Introduction

Since the identification of the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) as the etiologic agent of AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), many efforts have been made to stop the AIDS pandemic. A major success of medical research has been the development of the highly active antiretroviral therapy. However, a safe and effective vaccine able to prevent and eradicate the HIV pandemic is still lacking and its development remains a daunting challenge that faces major obstacles.

Abundant data have shown that broadly neutralizing antibodies (bnAbs) are induced in natural HIV infection and that such bnAbs, provided by passive transfer, can both protect from HIV in robust animal models and affect ongoing HIV infection in humans [1]. This suggests that stimulation of nAbs with broad specificity for all HIV variants by a vaccine is undoubtedly the best approach [2]. However, eliciting such bnAbs by vaccination is fraught with difficulties. The envelope (Env) HIV protein is a heavily glycosylated trimeric protein consisting of three glycoprotein (gp) 120 molecules noncovalently associated with three transmembrane gp41 molecules [3]. This unique system has formidable defenses that hinder bnAbs development, linked to its conformational dynamic and extremely variable sequence. Thus, the use of HIV-1 in live/attenuated vaccine formulations and other traditional vaccine approaches was unworkable or inefficacious, whereas extraordinary progress has been made in understanding the immune response to HIV infection and in defining viral targets. We now have a detailed vision of the obstacles we face, including the discovery and characterization of potent bnAbs isolated from both infected individuals and immunized animals, the description of the structure of the Env trimer, which

is the sole target of nAbs and the determination of the course of Ab-virus coevolution in individuals who develop bnAbs responses. These new parameters serve to design new immunogens and strategies for HIV bnAbs-based vaccines.

Although many vaccine candidates are composed of the whole virus or specific proteins, the use of only a minimal pathogen epitope which can stimulate long-lasting protection is becoming a tendency in vaccine development. Peptide-based vaccines are a major focus of this field since they are easier to produce and show more stability than whole proteins. Furthermore, synthetic peptides have several benefits compared to other kinds of antigens, showing an absence of potentially damaging materials, lower antigen complexity, and low costs for scaling up. Regarding the immune response, peptide-based vaccines can generate specific responses and they can be combined to design multi-epitopes and/or multi-specific vaccines. Peptide vaccine studies, which were becoming increasingly marginalized just a few years ago, are now on the rise as a promising approach for the rational design of vaccines.

In this review, we report recent developments in the design of peptide-vaccines aimed at inducing bnAbs. We will be focused on considerations for their design and delivery, taking into account some recent peptide-vaccine candidates that are rapidly expanding this new area of research to develop a potent and affordable HIV-vaccine.

2. Considerations for The Design of Peptide Vaccines

A variety of considerations need to be made during the design of a peptide vaccine, in the context of the particular vaccine under development. First and foremost is the identification of immuno-dominant domains in the HIV envelope glycoproteins, which form the sole entry complex for HIV. Further major challenges are how to avoid inactivation or degradation by the immune system and how to enhance the immunogenicity of those peptides. Thus, challenges in vaccine formulation should be considered, such as antigen-carrier systems, adjuvants, the formulation, and the route of administration [4,5]. The appropriate carrier system for delivery and right formulation to produce an adjuvant effect are essential. A search in clinicaltrial.gov proposes 591 clinical studies using peptide vaccines (2019 Data Base). Yet, the design of an efficient antigen-carrier vaccine necessitates the identification of the potential correlate or surrogate of protection [6,7].

3. Strategies for Peptide Mapping

For the development of a broad-spectrum vaccine against multiple viral serotypes for maximum clinical benefits [8], it might be necessary to identify highly conserved epitopes. Epitope choice is a crucial stage in the development of a peptide vaccine; the epitopes must be able to induce strong, long-lasting bnAbs activity against HIV. These Abs target the viral entry machinery in the HIV Env protein and have characteristics that might make them difficult to elicit by vaccination, including targeting the CD4-binding site which has extensive somatic hypermutation, the trimer apex that requires unusual recombination, the glycan-V3 supersite that requires the recognition of N-linked glycan, and the membrane-proximal external region [9]. Infection with HIV-1 results in Ab responses to most viral proteins; however, Abs to the surface Env are the most capable of mediating virus neutralization [2], thus, the Env immunogen seems to be the most relevant target for the induction of such Abs by vaccination. However, Env has evolved a number of immune evasion strategies that create a major hurdle for vaccine design, particularly its extensive amino acid variation, structural and conformational instability, and immunodominance of hypervariable regions [3,10]. Furthermore, despite some functionally conserved requirements for viral entry, genes encoding Env display an enormous amount of diversity and can be divided into genetic subtypes A–K, also called clades. Progress in understanding bnAbs and insight into the structural characteristics of both the Env and Abs have led to ways to think about the development of bnAbs and to propose strategies for their induction. Notably, several targets for bnAbs have been characterized, including the CD4-binding site, gp120 V1-V2 glycan, V3-glycan, and the interface between gp120-Gp41, the gp41 fusion domain, and the gp41 envelope proximal external region [2].

Today, a new wave of technological breakthroughs over the past decade have potentiated the identification of new epitopes [11]. The first strategy is the in-silico approach that usually focuses on predicting B-cell epitopes. Until recently, vaccine development was associated with conventional methods such as biochemical, immunological, and microbiological approaches using the whole or part of the HIV envelope proteins. With the advent of post-genomic techniques and informatics for immune system data analysis, reverse vaccinology is becoming a useful tool to design and develop vaccines; in short, reverse vaccinology uses immunoinformatics for epitope mapping using predictive algorithms that are able to predict B-cell peptide epitopes [12]. Various studies have been performed using peptide epitope predictions for previously known immunogenic proteins. These algorithms have become more powerful in predicting epitopes and can be combined to increase the accuracy of large-scale peptide epitope predictions in HIV. For example, Bricault et al. [13] recently demonstrated that bnAbs signatures can be used to engineer HIV-1 Env vaccine immunogens capable of eliciting Ab responses with greater neutralization breadth by a machine-learning-based prediction approach [13,14]. The second strategy is in vitro toward the discovery of new epitopes by a phage display technology, resulting in the expression of a peptide that mimics the structure of an epitope. This reverse technology approach was used to select peptides that mimic HIV-1 epitopes recognized by different bnAbs such as VRC01 [15–17]. Alternatively, immunodominance assays and peptide competition assays are used to identify and characterize new epitopes based on antigen-presenting cells (APCs) or fluorescence-labeled peptides.

4. Strategies to Increase Immunogenicity

Viruses and other natural pathogens are recognized by the innate defense systems as a danger signal and alert the immune system of the presence of invaders. Antigen-presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs) or macrophages, are able to recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) via pattern recognition receptors (PRRs), such as toll-like receptors (TLRs) [18]. Clearly, these motifs are missing in peptide-based vaccines, which necessitates adjuvants for the stimulation of innate cells for the induction of adaptive immunity. Peptides are poorly taken up by antigen-presenting cells (APC) via MHC molecules and thus result in the inefficient priming of CD4⁺ T cells, with consequently a low production of Abs. To bypass this side-effect, peptide-based vaccines require a carrier to be presented, as well as efficient adjuvants and an appropriate delivery system to be effective.

In the late 1920's, Landsteiner, Avery, and Goebel showed that the immunogenicity of polysaccharides could be enhanced by coupling to a protein. Five major carrier proteins have been used in licensed conjugate vaccines: A genetically modified Cross-Reacting Material (CRM) of the diphtheria toxin (DT), the tetanus toxoid (TT), the meningococcal outer membrane protein complex (OMPC), the diphtheria toxoid, and *Haemophilus influenzae* protein D (HiD) [19]. Several parameters need to be considered: (1) Small molecules need to be preserved from degradation and the initial conformation of the epitope needs to be conserved for B cell responses (formulation, adjuvants), (2) there needs to be a bridge to T cell help (carrier addition), and (3) the peptide-epitope might not have conserved the initial conformation for B cell responses (linker to carrier). Some modifications are thus necessary to stabilize the peptide conformation. For example, flanking sequences at the C and N terminus "cassette" would help in conformational stabilization within alpha-helical coiled coil proteins [20]. This approach has been developed and applied to two proteins: The Streptococcal M protein and *Caenorhabditis elegans* para-myosin UNCoordinated-15 (UNC-15) protein for antigenic B cell epitopes. In some cases, an artificial bond between two side chains of amino acid could be envisaged. Bird et al. [21] explored the capacity of peptide stapling to generate high fidelity, protease-resistant mimics of antigenic structures for HIV-1 gp41 epitopes. Stabilized α -helices of the membrane proximal external region (SAH-MPER) of gp41 were shown to be protease-resistant and bound to the broadly neutralizing 4E10 and 10E8 Abs with high affinity [22]. However, these methods need to be used carefully; increasing or decreasing the affinity of epitopes to Abs might suppress their immunogenicity and induce tolerance. Epitope stapling and peptide cyclisation has been a popular strategy in HIV vaccine development. Different metabolic additions could help to stabilize the peptide, including amidation of the C-terminus and carbohydrate or

lipid addition [11,21–23]. To target APCs, peptides could be coupled to mannose or glycan that bind to C-lectin present at the cell surface of DCs and macrophages [24]. In addition, some designs of vaccine candidates have given careful consideration to coupling the peptide with a plasma membrane transporter protein to facilitate its penetration into the cell. The most popular was a peptide of the Tat protein from HIV-1 that passes through the cell membrane [25]. To increase the up take by cells, the Tat peptide was coupled with several other peptides. This peptide was also used in combination with the amphipathic alpha-helical antitumor peptide (HPRP-A1) to increase the rate of cellular uptake and allow a stronger antitumor activity [26].

The delivery system is another major challenge in peptide vaccine development to induce the correct cellular cascade for the production of bnAbs. Proper targeting of small antigens, such as peptides to APC, lead to T helper (Th) cells for B cell activation and the production of Abs [27]. Several populations of dendritic cells (DCs) have been shown to control T Follicular Helper (Tfh) induction and, thus, B-cell activation and Ab responses. Depending on the route of immunization, myeloid DCs, conventional DCs, and Langerhans cells in the skin might control Tfh induction in humoral responses [28–32]. Activation of Tfh cells thus has a pivotal role in B cell differentiation and the formation of germinal centers (GCs) in lymphoid tissue [33]; they are essential for GC maintenance and for affinity maturation. The concept of antigen-carrier system delivery also includes the solicitation of both T and B cell responses and the induction of a memory response to the vaccine for long-term protection. There is an extensive variety of adjuvants that show in vitro efficacy in the induction of immune responses against peptides. The first approved vaccine adjuvant was aluminum hydroxide (Alum); it was developed by Glenny et al. in 1926 with the diphtheria toxoid absorbed to Alum, and used for over eight decades [34]. However, Alum poorly absorbs peptides and might expose them to proteolytic degradation, suggesting that the peptides might lose their potency to induce protective immune responses. In 1936, Freund developed an emulsion of water and mineral oil including killed mycobacteria, known as Freund's adjuvant, a gold standard adjuvant for efficacy, however, it induces severe local necrotic ulcers and is thus considered as too toxic for human use [35]. Fortunately, several new adjuvants were approved by the FDA and Europe for human vaccines, such as MF59, virosome, AS03, AF03, and AS04 (monophosphoryl lipid A (MPL) with Alum). MF59 is composed of squalene and is produced by Novartis Vaccines and Diagnostics Inc. It is used as an adjuvant component of the influenza vaccine for elderly patients (Fluad®, Novartis Vaccines and Diagnostics, Cambridge, MA, USA) [18,36]. It has also been shown that an oil in water emulsion provides a slow release of a peptide-based cancer vaccine for sustained antigenic stimulation of adaptive immunity [37]. The potency of the emulsion could depend also on the surfactant. Indeed, montanide TM ISA51 includes mono-oleate in addition to the squalene emulsion and has been used for melanoma peptide formulation in a clinical trial [38,39]. Interestingly, some adjuvants can be used in combination; several examples have been already approved by the FDA, such as Cervarix, a vaccine from GSK Biologicals (London, United Kingdom), composed of the TLR4 agonist monophosphoryl lipid A (MPLA) together with Alum.

The peptide-carrier or peptide alone can also be trapped in liposomes or covalently linked to liposomes to be delivered. Their composition of an aqueous core and lipid bilayer outside has the advantage of mimicking cell membranes [8,40], and thus, is biocompatible and adapted to delivery to APCs. As an example, the influenza peptide (H3N2 NP366–374) conjugated with an oleyl liposome protects against an influenza virus challenge. It is important to note that modification of the liposome size, charge, and injection routes might modify the quality of the immunological outcome, such as T_H1 versus T_H2 responses [41–43]. Some studies have shown that pH sensitive liposomes release their contents into the cytosol after fusion with the endosomal membrane and promote CTL responses. Such studies were conducted with the HPV, peptide, or HIV peptides [44,45].

5. Peptide-Based Vaccination for Antibody Responses against HIV

Substantial efforts have been made to create a stabilized Env trimer that elicit Abs potently effective against a broad range of HIV-1 circulating strains [10,46,47]. A parallel approach that relies on capturing Env sequences that have elicited bnAbs in infected individuals has also been developed. A unique patient cohort was mined to select and express soluble Env immunogens from patient sequences most relevant to viral transmission, including Env from founder viruses of diverse clades, and from “elite neutralizers” [48]. Of note, the majority of identified bnAbs have characteristics that make them difficult to elicit by vaccination since extensive somatic hypermutation appears to be required. These features reflect a long and intensive selection process from which high affinity B cells are generated in the germinal center [33,49].

Even though the focus of HIV vaccine studies has been on the Env protein in its trimeric form, other approaches defining precise target of Abs combined with structural biology have provided evidence for an epitope-based vaccine candidate. In addition, to overcome the viral diversity of HIV-1, most of the strategies drive the Ab response towards the more conserved epitopes of Env. The major peptide-vaccines are reported in Table 1. Several are HIV-specific peptide epitopes selected by screening random libraries with HIV-1 positive sera [50]. Among these different peptide-vaccines, Palker et al. [51] described some Env-encoded synthetic peptides coupled to the tetanus toxoid that raised high titers of isolate-specific anti-HIV bnAbs. These peptides were selected from phage libraries with plasma Abs from HIV-infected Long-Term Non-Progressor (LTNP) patients. The mimotope sequences were analyzed for homology to HIV-1 Env, in particular for their capacity to represent conformational epitopes on the surface of the gp120 structure, and then coupled to a sequential oligopeptide carrier (SOC) and palmitic acid for vaccination. Their capacity to induce bnAbs was confirmed in preclinical models [51].

Table 1. List of peptide discovery-based HIV vaccine candidates inducing non neutralizing and neutralizing antibody responses.

Epitope	Carrier	Pre-Clinical Test	Humoral	Translation into Clinical Studies	Ref.
Peptide screening library		Mice	bnAbs	none	[50]
		Macaques	Reduction viremia below the levels of detection	none	[52,53]
V3 peptides		Mice	bnAbs	none	[54]
EC26-2A4	SOC*/palmitoyl acid KLH	Mice Mice	bnAbs bnAbs	none none	[53] [55]
DPI178 and structured analogs	KLH	Guinea pigs	Abs	none	[56]
3S motif	KLH	Macaques	Prevented a decline in CD4+ T cells Significant increase in CD4+ T cellsNatural bnAb detected in HIV-1+ patients		[53,57]
	CRM197	Human		Clinical study Phase II	[58,59]
W614A 3S motif	KLH	MiceHuman	bnAbs Natural bnAb detected in HIV-1+ patients (LTNP)	Planned for 2020	[59,60]
Fusion Peptide (FP)	KLH	Mice, Guinea pigNon-human Primates	bnAbs	none	[61,62]

* SOC: oligopeptide carrier.

Although in theory high-affinity Abs that recognize the relatively conserved Gly-Pro-Gly-Arg (GPGR) core sequence of the HIV-1 Env V3 tip region could potentially neutralize many strains of the HIV-1 clade B, in practice, such Abs in sera from HIV-infected individuals show little neutralization activity in vitro, suggesting that the immunogenicity of the GPGR sequence is low. To overcome this problem, Eda et al. [54] sequentially immunized mice with V3 peptides from HIV-1 clade B field isolates, resulting in the induction of cross-neutralizing Abs against primary isolates. Alternatively, by a bioinformatics approach, an innovative multivalent HIV-1 vaccine was developed, comprising of a pool of 176 peptides representing variable regions of the Env and Gag proteins. In macaques,

a neutralizing activity against 14 HIV-1 primary isolates from subtypes A–E was observed in three to six macaques, according to in vitro assays [52]. This was the first time that bnAbs had been demonstrated against HIV-1 isolates using linear hypervariable epitopes as immunogens, however, the potential efficacy of this strategy against an SIV challenge is still unclear.

Another peptide of 29 amino acids that overlaps with the epitope of the first generation 2F5 mAb was also identified with the aim of eliciting bnAbs upon vaccination. After optimization, the EC26-2A4 peptide was tested for its immunogenicity and potency to induce bnAbs in a preclinical model [55]. The design of a peptide carbohydrate is another approach to explore novel vaccine candidates to elicit neutralizing antigens, based on a peptide DP178 (mimotope) that inhibits the viral fusion of HIV-1 and is recognized by 2F5 bnAbs. Enhancement of α -helicity in the DP178 leads to an increased affinity to 2F5 without eliciting bnAbs [56]. However, the breadth of these bnAbs is still questionable.

Recently, Kwong and colleagues [61] described a vaccination scheme based on the fusion peptide, a critical element of the HIV-1 entry machinery. The fusion peptide comprises a hydrophobic region (residues 512–527) at the N terminus of the gp41 transmembrane subunit of the HIV-1 Env trimer. They identified an Ab N123-VRC34.01 from a HIV+ donor that targets the conserved N-terminal region of the HIV-1 fusion peptide. Immunization with this FP8 peptide (residues 512–519) coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH), followed by Env trimer boosts, elicited cross-clade neutralizing responses [61]. In mice, the FP8 elicited monoclonal Abs capable of neutralizing 31% of a cross-clade panel of 208 HIV-1 strains. In guinea pigs and rhesus macaques, a serum neutralization breadth of 20% or higher-as assessed across a panel of 208 isolates-was only observed sporadically [61]. Consistent elicitation of cross-clade HIV-neutralizing responses were, however, achieved in guinea pigs by repetitive envelope trimer boosting [62]. More recent data of cryo-electron microscopy of vaccine-elicited Abs in complex with Env trimer revealed focused recognition of the fusion peptide and provided a structural basis for development of neutralization breadth, suggesting that the breadth of vaccine-elicited antibodies targeting the fusion peptide can be enhanced by specific interactions with additional portions of Env [63,64].

Another promising peptide of gp41 has been identified as a potential vaccine candidate [56]. The 3S motif of gp41 is located in the gp41 loop region (according to the position of gp160 of the BRU HIV-1 strain) and is remarkably conserved and specific to HIV-1 strains. This epitope is located at the interface between the cell membrane and HIV-1 Env protein (Vieillard et al., personal communication). These features indicate that this motif is probably important for the conformation and/or the functionality of the virus [65]. Natural anti-3S Abs have been found in several cohorts of HIV patients and are related to disease parameters. In HIV progressors, anti-3S Abs are detected in 28% of patients and are highly correlated with CD4⁺ T cell counts. In addition, in the SEROCO cohort of seroconvertors (French National Agency for Research on AIDS; ANRS), a high level of anti-3S Abs delayed spontaneous disease progression independently of viral load and CD4 count. Of note, natural anti-3S Abs detected in HIV patients were non-neutralizing. From these data, the VAC-3S therapeutic vaccine was developed, comprising the 3S peptide coupled with the CRM197 carrier protein formulated in an aluminum salt adjuvant (licensed by Minka Therapeutics). Moreover, a multi-center phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study revealed that VAC-3S is safe, immunogenic, and associated in high responders with an increase in non-exhausted CD4⁺ T cells [58].

The unique properties of the 3S peptide were further studied by alanine-scanning of the 3S motif. A specific substitution at position 614 (called W614A-3S) is able to elicit neutralizing Abs in mice with the capacity to block viral infection [60]. These data demonstrate that W614A-3S is antigenic and that natural anti-W614A-3S Abs were also observed in approximately 5% of HIV-1 patients with high CD4 counts. These natural Abs were immunoglobulin G isotypes and detected exclusively in patients with high CD4 counts and undetectable viral loads (<20 copies/mL). The W614A-3S purified Abs from most patients were able to neutralize high titers of all tier 1 (clade B and C) and most of tier 2 viruses of clade B tested. Strikingly, purified Abs from one of these five patients was also reactive against tier 2 clade C (PSV-TV1) and clade E (PSV-CM244) viruses. No W614A-3S purified Abs neutralized HIV-2 ROD or

VSV, which were used as negative controls [60]. Interestingly, the presence of anti-W614A-3S nAbs was rarely observed in HIV-1 progressors but was significantly increased in untreated LTNP patients of the ALT ANRS cohort that had been infected more than 7 years but did not declare the disease. The presence of W614A-3S Abs was inversely correlated with viral load and viral DNA and associated with preservation of the CD4 count, however, these Abs were also found to be able to neutralize most of the HIV-1 clade B viruses tested [66], providing a strong argument that W614A-3S nAbs might contribute to the LTNP status. In order to test the immunogenicity of the W614A-3S motif, two different carrier proteins have been used: KLH (preclinical studies only) and CRM-197 (preclinical and proposed clinical studies). W614A-3S-KLH in Incomplete Freund Adjuvant was shown to be immunogenic in a mouse model and induced Ab responses with cross-clade neutralizing activities [60]. This effect has also been shown in macaque cynomolgus and in rabbits (Vieillard et al., personal communication). Translation of this new peptide-vaccine candidate into an experimental medicine study is planned for 2020 and will speed up progress in HIV-1 vaccine development.

An important question concerns whether animal models need to be used to test these peptide-based vaccine candidates. The vast majority of HIV research has been performed using either humanized mice or NHP HIV models. Under the umbrella terms “NHP” and “humanized mice” are a myriad of noteworthy model characteristics [66]. Although no perfect animal model for human disease exists, each of these systems has advantages and disadvantages for assessing new bnAbs that target the HIV-1 Env protein in a peptide-vaccine strategy. The question remains of whether or not there should be a standardized mode. Differences in SIV and SHIV replication in the rhesus macaque, cynomolgous, and pigtailed macaque species have been observed and favor the design of experimental models depending on the question asked. For vaccine research, the rhesus macaque presents the ideal model for pathogenesis research, however, demanding its use as a standard presents problem, and the current trend is to base considerations on transgenic mouse models. Most of the recent animal model research has focused on evaluating vaccine candidates that might elicit bnAbs.

In conclusion, due to the enormous progress in GMP production, and the safety and immunogenicity of several peptide-carrier vaccines against infectious diseases, “epitope-based vaccine” discovery has become one of the challenges of this decade and has gained interest in the field of HIV-vaccine development. Studying the structure of the envelop protein conformation and how to conserve the epitope that could be targeted by natural bnAbs will help in the development of novel peptide-vaccine candidates.

With regard to the Thai RV144 trial, the generation of partially protective non-neutralizing Abs questions the role of the other Ab functions, such as Ab-dependent cellular cytotoxicity, Ab-dependent cellular phagocytosis, or aggregation [67]. These other functions of Abs should be also considered and used to predict vaccine efficacy. Finally, implementation of more clinical trials with peptide-vaccines should foster research in the development of a safe and effective vaccine against HIV.

Author Contributions: M.B. and C.C. collected the data; B.C. and V.V. wrote the review. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding: Authors have received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 681137.

Acknowledgments: We thank Professor Patrice Debre (CIMI-Paris, Paris, France) for helpful discussion.

Conflicts of Interest: B.C. and V.V. are members of scientific advisory board of Minka therapeutics.

References

1. Caskey, M.; Klein, F.; Nussenzweig, M.C. Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 547–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Burton, D.R.; Hangartner, L. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34*, 635–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Falkowska, E.; Le, K.M.; Ramos, A.; Doores, K.J.; Lee, J.H.; Blattner, C.; Ramirez, A.; Derking, R.; Van Gils, M.J.; Liang, C.-H.; et al. Broadly Neutralizing HIV Antibodies Define a Glycan-Dependent Epitope on the Prefusion Conformation of gp41 on Cleaved Envelope Trimmers. *Immun.* **2014**, *40*, 657–668. [CrossRef] [PubMed]
4. De Gregorio, E.; Rappuoli, R. From empiricism to rational design: A personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 505–514. [CrossRef] [PubMed]
5. Rappuoli, R.; Santoni, A.; Mantovani, A. Vaccines: An achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. *J. Exp. Med.* **2018**, *216*, 7–9. [CrossRef] [PubMed]
6. Heaney, J.L.; A Plotkin, S. Immunological correlates of protection from HIV infection and disease. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 1281–1284. [CrossRef]
7. Plotkin, S.A. Vaccines: Past, present and future. *Nat. Med.* **2005**, *10*, S5–S11. [CrossRef]
8. Matyas, G.R.; Mayorov, A.V.; Rice, K.C.; Jacobson, A.E.; Cheng, K.; Iyer, M.R.; Li, F.; Beck, Z.; Janda, K.D.; Alving, C.R. Liposomes Containing Monophosphoryl Lipid A: A Potent Adjuvant System For Inducing Antibodies To Heroin Hapten Analogs. *Vaccine* **2013**, *31*, 2804–2810. [CrossRef]
9. Sok, D.; Burton, D.R. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 1179–1188. [CrossRef]
10. Klasse, P.J.; Ketts, T.J.; Cottrell, C.A.; Ozorowski, G.; Debnath, G.; Camara, D.; Francomano, E.; Pugach, P.; Ringe, R.P.; Labranche, C.C.; et al. Epitopes for neutralizing antibodies induced by HIV-1 envelope glycoprotein BG505 SOSIP trimers in rabbits and macaques. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1006913. [CrossRef]
11. Kwong, P.D.; Mascola, J.R. HIV-1 Vaccines Based on Antibody Identification, B Cell Ontogeny, and Epitope Structure. *Immun.* **2018**, *48*, 855–871. [CrossRef] [PubMed]
12. Rappuoli, R.; Bottomley, M.J.; D’Oro, U.; Finco, O.; De Gregorio, E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 469–481. [CrossRef] [PubMed]
13. Bricault, C.A.; Yusim, K.; Seaman, M.S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Giorgi, E.E.; Wagh, K.; Theiler, M.; Hraber, P.; Macke, J.P.; et al. HIV-1 Neutralizing Antibody Signatures and Application to Epitope-Targeted Vaccine Design. *Cell Host Microbe* **2019**, *25*, 59–72. [CrossRef] [PubMed]
14. Magaret, C.A.; Benkeser, D.C.; Williamson, B.D.; Borate, B.R.; Carpp, L.N.; Georgiev, I.S.; Setliff, I.; Dingens, A.S.; Simon, N.; Carone, M.; et al. Prediction of VRC01 neutralization sensitivity by HIV-1 gp160 sequence features. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1006952. [CrossRef] [PubMed]
15. Delhalle, S.; Schmit, J.C.; Chevigné, A. Phages and HIV-1: From display to interplay. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 4727–4794. [CrossRef] [PubMed]
16. Chikaev, A.N.; Bakulina, A.Y.; Burdick, R.C.; Karpenko, L.I.; Pathak, V.K.; Ilyichev, A.A. Selection of Peptide Mimics of HIV-1 Epitope Recognized by Neutralizing Antibody VRC01. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120847. [CrossRef] [PubMed]
17. Dorgham, K.; Pietrancosta, N.; Affoune, A.; Lucar, O.; Bouceba, T.; Chardonnet, S.; Pionneau, C.; Piesse, C.; Sterlin, D.; Guardado-Calvo, P.; et al. Reverse Immunology Approach to Define a New HIV-gp41-Neutralizing Epitope. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
18. Del Giudice, G.; Rappuoli, R.; Didierlaurent, A.M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin. Immunol.* **2018**, *39*, 14–21. [CrossRef] [PubMed]
19. Pichichero, M. Protein carriers of conjugate vaccines: Characteristics, development and clinical trials. *Hum. Vaccines Immunother.* **2013**, *9*, 2505–2523. [CrossRef] [PubMed]
20. Cooper, J.A.; Hayman, W.; Reed, C.; Kagawa, H.; Good, M.F.; Saul, A. Mapping of conformational B cell epitopes within alpha-helical coiled coil proteins. *Mol. Immunol.* **1997**, *34*, 433–440. [CrossRef]
21. Bird, G.H.; Irimia, A.; Ofek, G.; Kwong, P.D.; Wilson, I.A.; Walensky, L.D. Stapled HIV-1 Peptides Recapitulate Antigenic Structures and Engage Broadly Neutralizing Antibodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 1058–1067. [CrossRef]
22. McGaughey, G.B.; Citron, M.; Danzeisen, R.C.; Freidinger, R.M.; Garsky, V.M.; Hurni, W.M.; Joyce, J.G.; Liang, X.; Miller, M.; Shiver, J.; et al. HIV-1 Vaccine Development: Constrained Peptide Immunogens Show Improved Binding to the Anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochem.* **2003**, *42*, 3214–3223. [CrossRef]
23. Cardoso, R.M.; Brunel, F.M.; Ferguson, S.; Zwick, M.; Burton, D.R.; Dawson, P.E.; Wilson, I.A. Structural Basis of Enhanced Binding of Extended and Helically Constrained Peptide Epitopes of the Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody 4E10. *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 1533–1544. [CrossRef]

24. Sheng, K.-C.; Kalkanidis, M.; Pouniotis, D.S.; Esparon, S.; Tang, C.K.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G.A. Delivery of antigen using a novel mannosylated dendrimer potentiates immunogenicity in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 424–436. [CrossRef]
25. Frankel, A.D.; Pabo, C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193. [CrossRef]
26. Hao, X.; Yan, Q.; Zhao, J.; Wang, W.; Huang, Y.; Chen, Y. TAT Modification of Alpha-Helical Anticancer Peptides to Improve Specificity and Efficacy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138911. [CrossRef]
27. Boscardin, S.B.; Hafalla, J.C.; Masilamani, R.F.; Kamphorst, A.O.; Zebroski, H.A.; Rai, U.; Morrot, A.; Zavala, F.; Steinman, R.M.; Nussenzweig, R.S.; et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 599–606. [CrossRef]
28. Bonifaz, L.C.; Bonnyay, D.P.; Charalambous, A.; Darguste, D.I.; Fujii, S.-I.; Soares, H.; Brimnes, M.K.; Molledo, B.; Moran, T.M.; Steinman, R.M. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 815–824. [CrossRef]
29. Levin, C.; Perrin, H.; Combadiere, B. Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. *Hum. Vaccines Immunother.* **2015**, *11*, 27–36. [CrossRef]
30. Levin, C.; Bonduelle, O.; Nuttens, C.; Primard, C.; Verrier, B.; Boissonnas, A.; Combadiere, B. Critical Role for Skin-Derived Migratory DCs and Langerhans Cells in TFH and GC Responses after Intradermal Immunization. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137*, 1905–1913. [CrossRef]
31. Pratama, A.; Vinuesa, C.G. Control of TFH cell numbers: Why and how? *Immunol. Cell Biol.* **2013**, *92*, 40–48. [CrossRef]
32. Vardam, T.; Anandasabapathy, N. Langerhans Cells Orchestrate TFH-Dependent Humoral Immunity. *J. Investig. Dermatol.* **2017**, *137*, 1826–1828. [CrossRef]
33. Gitlin, A.D.; Mayer, C.T.; Oliveira, T.Y.; Shulman, Z.; Jones, M.J.; Koren, A.; Nussenzweig, M.C. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Sci.* **2015**, *349*, 643–646. [CrossRef]
34. Glenny, A.T.; Pope, C.G.; Waddington, H.; Wallace, U. Immunological notes: XVII–XXIV. *J. Pathol. Bacteriol.* **1926**, *29*, 31–40. [CrossRef]
35. Awate, S.; Babiuk, L.A.; Mutwiri, G. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 114. [CrossRef]
36. Coffman, R.L.; Sher, A.; Seder, R.A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immun.* **2010**, *33*, 492–503. [CrossRef]
37. Iseki, K.; Matsunaga, H.; Komatsu, N.; Suekane, S.; Noguchi, M.; Itoh, K.; Yamada, A. Evaluation of a new oil adjuvant for use in peptide-based cancer vaccination. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 2110–2114. [CrossRef]
38. Nagata, T.; Toyota, T.; Ishigaki, H.; Ichihashi, T.; Kajino, K.; Kashima, Y.; Itoh, Y.; Mori, M.; Oda, H.; Yamamura, H.; et al. Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. *Vaccine* **2007**, *25*, 4914–4921. [CrossRef]
39. Slingluff, C.L.; Yamshchikov, G.; Neese, P.; Galavotti, H.; Eastham, S.; Engelhard, V.H.; Kittlesen, D.; Deacon, D.; Hibbitts, S.; Grosh, W.W.; et al. Phase I trial of a melanoma vaccine with gp100 (280–288) peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: Immunologic and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3012–3024.
40. Alving, C.R.; Peachman, K.K.; Rao, M.; Reed, S.G. Adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, *24*, 310–315. [CrossRef]
41. Mann, J.F.; Shakir, E.; Carter, K.C.; Mullen, A.B.; Alexander, J.; Ferro, V.A. Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine* **2009**, *27*, 3643–3649. [CrossRef] [PubMed]
42. Bachmann, M.F.; Jennings, G.T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 787–796. [CrossRef]
43. Leroux-Roels, G.; Van Belle, P.; Vandepapelière, P.; Horsmans, Y.; Janssens, M.; Carletti, I.; Garçon, N.; Wettenhoff, M.; Van Mechelen, M. Vaccine Adjuvant Systems containing monophosphoryl lipid A and QS-21 induce strong humoral and cellular immune responses against hepatitis B surface antigen which persist for at least 4 years after vaccination. *Vaccine* **2015**, *33*, 1084–1091. [CrossRef]
44. Chang, J.-S.; Choi, M.-J.; Cheong, H.-S.; Kim, K. Development of Th1-mediated CD8⁺ effector T cells by vaccination with epitope peptides encapsulated in pH-sensitive liposomes. *Vaccine* **2001**, *19*, 3608–3614. [CrossRef]

45. Chang, J.-S.; Choi, M.-J.; Kim, T.-Y.; Cho, S.Y.; Cheong, H.-S. Immunogenicity of synthetic HIV-1 V3 loop peptides by MPL adjuvanted pH-sensitive liposomes. *Vaccine* **1999**, *17*, 1540–1548. [CrossRef]
46. Pauthner, M.; Havenar-Daughton, C.; Sok, D.; Nkolola, J.P.; Bastidas, R.; Boopathy, A.V.; Carnathan, D.G.; Chandrashekhar, A.; Cirelli, K.M.; Cottrell, C.A.; et al. Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using Optimized Approaches. *Immun.* **2017**, *46*, 1073–1088.e6. [CrossRef] [PubMed]
47. Aldon, Y.; McKay, P.F.; Allen, J.; Ozorowski, G.; Felföldiné Lévai, R.; Tolazzi, M.; Rogers, P.; He, L.; de Val, N.; Fábián, K.; et al. Rational Design of DNA-Expressed Stabilized Native-Like HIV-1 Envelope Trimers. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 3324–3338.e5. [CrossRef]
48. van Gils, M.J.; van den Kerkhof, T.L.G.M.; Ozorowski, G.; Cottrell, C.A.; Sok, D.; Pauthner, M.; Pallesen, J.; de Val, N.; Yasmeen, A.; de Taeye, S.W.; et al. An HIV-1 antibody from an elite neutralizer implicates the fusion peptide as a site of vulnerability. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 16199. [CrossRef]
49. McHeyzer-Williams, L.J.; Milpied, P.J.; Okitsu, S.L.; McHeyzer-Williams, M.G. Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 296–305. [CrossRef]
50. Scala, G.; Chen, X.; Liu, W.; Telles, J.N.; Cohen, O.J.; Vaccarezza, M.; Igarashi, T.; Fauci, A.S. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 6155–6161.
51. Parker, T.J.; Clark, M.E.; Langlois, A.J.; Matthews, T.J.; Weinhold, K.J.; Randall, R.R.; Bolognesi, D.P.; Haynes, B.F. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 1932–1936. [CrossRef]
52. Azizi, A.; Anderson, D.E.; Torres, J.V.; Ogrel, A.; Ghorbani, M.; Soare, C.; Sandstrom, P.; Fournier, J.; Diaz-Mitoma, F. Induction of broad cross-subtype-specific HIV-1 immune responses by a novel multivalent HIV-1 peptide vaccine in cynomolgus macaques. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 2174–2186. [CrossRef]
53. Chen, X.; Scala, G.; Quinto, I.; Liu, W.; Chun, T.-W.; Justement, J.S.; Cohen, O.J.; VanCott, T.C.; Iwanicki, M.; Lewis, M.G.; et al. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1225–1231. [CrossRef]
54. Eda, Y.; Takizawa, M.; Murakami, T.; Maeda, H.; Kimachi, K.; Yonemura, H.; Koyanagi, S.; Shiosaki, K.; Higuchi, H.; Makizumi, K.; et al. Sequential Immunization with V3 Peptides from Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Produces Cross-Neutralizing Antibodies against Primary Isolates with a Matching Narrow-Neutralization Sequence Motif. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5552–5562. [CrossRef]
55. Ringel, O.; Müller, K.; Koch, J.; Brill, B.; Wolf, T.; Stephan, C.; Vieillard, V.; Debré, P.; Dietrich, U. Optimization of the EC26-2A4 Epitope in the gp41 Membrane Proximal External Region Targeted by Neutralizing Antibodies from an Elite Controller. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2018**, *34*, 365–374. [CrossRef]
56. Joyce, J.G.; Hurni, W.M.; Bogusky, M.J.; Garsky, V.M.; Liang, X.; Citron, M.P.; Danzeisen, R.C.; Miller, M.D.; Shiver, J.W.; Keller, P.M. Enhancement of α -Helicity in the HIV-1 Inhibitory Peptide DP178 Leads to an Increased Affinity for Human Monoclonal Antibody 2F5 but Does Not Elicit Neutralizing Responses in Vitro: IMPLICATIONS FOR VACCINE DESIGN. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45811–45820. [CrossRef]
57. Vieillard, V.; Dereuddre-Bosquet, N.; Mangeot-Méderlé, I.; Le Grand, R.; Debré, P. An HIVgp41 vaccine protects CD4 central memory T cells in SHIV-infected macaques. *Vaccine* **2012**, *30*, 6883–6891. [CrossRef]
58. Vieillard, V.; Combadière, B.; Tubiana, R.; Launay, O.; Pialoux, G.; Cotte, L.; Girard, P.-M.; Simon, A.; Dudoit, Y.; Reynes, J.; et al. HIV therapeutic vaccine enhances non-exhausted CD4 $^{+}$ T cells in a randomised phase 2 trial. *Npj Vaccines* **2019**, *4*, 25. [CrossRef]
59. Lucar, O.; Su, B.; Potard, V.; Samri, A.; Autran, B.; Moog, C.; Debré, P.; Vieillard, V. Neutralizing Antibodies Against a Specific Human Immunodeficiency Virus gp41 Epitope are Associated with Long-term Non-progressor Status. *EBioMedicine* **2017**, *22*, 122–132. [CrossRef]
60. Petitdemange, C.; Achour, A.; Dispiseri, S.; Malet, I.; Sennepin, A.; Fang, R.H.T.; Crouzet, J.; Marcellin, A.-G.; Calvez, V.; Scarlatti, G.; et al. A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 745–755. [CrossRef]
61. Xu, K.; Acharya, P.; Kong, R.; Cheng, C.; Chuang, G.-Y.; Liu, K.; Louder, M.K.; O’Dell, S.; Rawi, R.; Sastry, M.; et al. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 857–867. [CrossRef]

62. Cheng, C.; Xu, K.; Kong, R.; Chuang, G.-Y.; Corrigan, A.R.; Geng, H.; Hill, K.R.; Jafari, A.J.; O'Dell, S.; Ou, L.; et al. Consistent elicitation of cross-clade HIV-neutralizing responses achieved in guinea pigs after fusion peptide priming by repetitive envelope trimer boosting. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215163. [[CrossRef](#)]
63. Dingens, A.S.; Acharya, P.; Haddox, H.K.; Rawi, R.; Xu, K.; Chuang, G.-Y.; Wei, H.; Zhang, B.; Mascola, J.R.; Carragher, B.; et al. Complete functional mapping of infection- and vaccine-elicited antibodies against the fusion peptide of HIV. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007159. [[CrossRef](#)]
64. Kong, R.; Duan, H.; Sheng, Z.; Xu, K.; Acharya, P.; Chen, X.; Cheng, C.; Dingens, A.S.; Gorman, J.; Sastry, M.; et al. Antibody Lineages with Vaccine-Induced Antigen-Binding Hotspots Develop Broad HIV Neutralization. *Cell* **2019**, *178*, 567–584.e19. [[CrossRef](#)]
65. Vieillard, V.; Strominger, J.L.; Debre, P. NK cytotoxicity against CD4⁺ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKP44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 10981–10986. [[CrossRef](#)]
66. Hessell, A.J.; Haigwood, N.L. Animal models in HIV-1 protection and therapy. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2015**, *10*, 170–176. [[CrossRef](#)]
67. Mayr, L.M.; Su, B.; Moog, C. Non-Neutralizing Antibodies Directed against HIV and Their Functions. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1590. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Bibliographie

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J.M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., and Winter, N. (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* *106*, 1843–1850.
- Abram, M.E., Ferris, A.L., Das, K., Quinoñes, O., Shao, W., Tuske, S., Alvord, W.G., Arnold, E., and Hughes, S.H. (2014). Mutations in HIV-1 reverse transcriptase affect the errors made in a single cycle of viral replication. *J. Virol.* *88*, 7589–7601.
- Aguzzi, A., Kranich, J., and Krautler, N.J. (2014). Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol.* *35*, 105–113.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* *272*, 54–60.
- Aldon, Y., McKay, P.F., Allen, J., Ozorowski, G., Felföldiné Lévai, R., Tolazzi, M., Rogers, P., He, L., de Val, N., Fábián, K., et al. (2018). Rational Design of DNA-Expressed Stabilized Native-Like HIV-1 Envelope Trimers. *Cell Rep.* *24*, 3324-3338.e5.
- Alfsen, A., and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J. Biol. Chem.* *277*, 25649–25659.
- Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H., and Essex, M. (1985). Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* *228*, 1091–1094.
- Allen, C.D.C., Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* *315*, 528–531.
- Allen, T.M., Altfeld, M., Geer, S.C., Kalife, E.T., Moore, C., O'sullivan, K.M., Desouza, I., Feeney, M.E., Eldridge, R.L., Maier, E.L., et al. (2005). Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J. Virol.* *79*, 13239–13249.
- Allie, S.R., and Randall, T.D. (2020). Resident Memory B Cells. *Viral Immunol.* *33*, 282–293.
- Ambrose, C.S., Yi, T., Walker, R.E., and Connor, E.M. (2008). Duration of protection provided by live attenuated influenza vaccine in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *27*, 744–748.
- Amigorena, S. (1999). Présentation antigénique par les cellules dendritiques. *médecine/sciences* *15*, 931.
- Anderson, E.J., Roush, N.G., Widge, A.T., Jackson, L.A., Roberts, P.C., Makhene, M., Chappell, J.D., Denison, M.R., Stevens, L.J., Pruijssers, A.J., et al. (2020). Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N. Engl. J. Med.* *383*, 2427–2438.

von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 867–878.

Ansel, K.M., McHeyzer-Williams, L.J., Ngo, V.N., McHeyzer-Williams, M.G., and Cyster, J.G. (1999). In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J. Exp. Med.* *190*, 1123–1134.

Appay, V., and Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* *214*, 231–241.

Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.-A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J.-C., Shorte, S., and Charneau, P. (2006). Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat. Methods* *3*, 817–824.

Arrildt, K.T., Joseph, S.B., and Swanstrom, R. (2012). The HIV-1 env protein: a coat of many colors. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *9*, 52–63.

Asrir, A., Aloulou, M., Gador, M., Péral, C., and Fazilleau, N. (2017). Interconnected subsets of memory follicular helper T cells have different effector functions. *Nat. Commun.* *8*, 847.

Audibert, F.M., and Lise, L.D. (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* *14*, 174–178.

Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P., and Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* *277*, 112–116.

Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol. Baltim. Md* *181*, 1767–1779.

Bachmann, M.F., and Jennings, G.T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 787–796.

Balazs, A.B., Chen, J., Hong, C.M., Rao, D.S., Yang, L., and Baltimore, D. (2011). Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* *481*, 81–84.

Balazs, A.B., Ouyang, Y., Hong, C.M., Chen, J., Nguyen, S.M., Rao, D.S., An, D.S., and Baltimore, D. (2014). Vectored immunoprophylaxis protects humanized mice from mucosal HIV transmission. *Nat. Med.* *20*, 296–300.

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

Bannard, O., Horton, R.M., Allen, C.D.C., An, J., Nagasawa, T., and Cyster, J.G. (2013). Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* *39*, 912–924.

Barouch, D.H., and Picker, L.J. (2014). Novel vaccine vectors for HIV-1. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 765–771.

Barouch, D.H., Liu, J., Li, H., Maxfield, L.F., Abbink, P., Lynch, D.M., Lampietro, M.J., SanMiguel, A., Seaman, M.S., Ferrari, G., et al. (2012). Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. *Nature* **482**, 89–93.

Barouch, D.H., Alter, G., Broge, T., Linde, C., Ackerman, M.E., Brown, E.P., Borducchi, E.N., Smith, K.M., Nkolola, J.P., Liu, J., et al. (2015). Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. *Science* **349**, 320–324.

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.

Basu, A., Hoerning, A., Datta, D., Edelbauer, M., Stack, M.P., Calzadilla, K., Pal, S., and Briscoe, D.M. (2010). Cutting edge: Vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO+ CD4+ T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN-gamma production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 545–549.

Bates, J.T., Uematsu, S., Akira, S., and Mizel, S.B. (2009). Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 7539–7547.

Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27.

Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* **411**, 489–494.

Baumjohann, D., Preite, S., Rebaldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* **38**, 596–605.

Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debre, P., and Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* **122**, 2935–2942.

Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**, 1121–1129.

Berger, E.A. (1998). HIV entry and tropism. When one receptor is not enough. *Adv. Exp. Med. Biol.* **452**, 151–157.

Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyö, E.-M., Korber, B.T.M., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R.A. (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240–240.

Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., et al. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781–4789.

Binley, J.M., Sanders, R.W., Clas, B., Schuelke, N., Master, A., Guo, Y., Kajumo, F., Anselma, D.J., Maddon, P.J., Olson, W.C., et al. (2000). A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J. Virol.* **74**, 627–643.

Bomsel, M., Tudor, D., Drillet, A.-S., Alfsen, A., Ganor, Y., Roger, M.-G., Mouz, N., Amacker, M., Chalifour, A., Diomede, L., et al. (2011). Immunization with HIV-1 gp41 Subunit Virosomes Induces Mucosal Antibodies Protecting Nonhuman Primates against Vaginal SHIV Challenges. *Immunity* **34**, 269–280.

Bonneau, M., Epardaud, M., Payot, F., Niborski, V., Thoulouze, M.-I., Bernex, F., Charley, B., Riffault, S., Guilloteau, L.A., and Schwartz-Cornil, I. (2006). Migratory monocytes and granulocytes are major lymphatic carriers of *Salmonella* from tissue to draining lymph node. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 268–276.

Boscardin, S.B., Hafalla, J.C.R., Masilamani, R.F., Kamphorst, A.O., Zebroski, H.A., Rai, U., Morrot, A., Zavala, F., Steinman, R.M., Nussenzweig, R.S., et al. (2006). Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J. Exp. Med.* **203**, 599–606.

Brelot, A., and Chakrabarti, L.A. (2018). CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis. *J. Mol. Biol.* **430**, 2557–2589.

Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., et al. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 749–759.

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

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

Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Lorin, V., Lortat-Jacob, H., Baleux, F., Bourdic, K., Noël, N., Lambotte, O., Mouquet, H., and Schwartz, O. (2017). Lack of ADCC Breadth of Human Nonneutralizing Anti-HIV-1 Antibodies. *J. Virol.* **91**, e02440-16.

Burton, D.R., and Hangartner, L. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 635–659.

Burton, D.R., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2005). Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14943–14948.

Butcher, E.C., and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60–66.

Calin, R., Bodilis, H., Fang, R.H.T., Launay, O., Katlama, C., Vieillard, V., and Gharakhanian, S. (2013). Etude de phase I/IIa de VAC-3S : un vaccin

immunothérapeutique/immunoprotecteur, en complément des antirétroviraux, au cours de l'infection VIH. 12.

Cannons, J.L., Yu, L.J., Jankovic, D., Crotty, S., Horai, R., Kirby, M., Anderson, S., Cheever, A.W., Sher, A., and Schwartzberg, P.L. (2006). SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *J. Exp. Med.* **203**, 1551–1565.

Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N., and Schwartzberg, P.L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* **32**, 253–265.

Carson, W.E., Yu, H., Dierksheide, J., Pfeffer, K., Bouchard, P., Clark, R., Durbin, J., Baldwin, A.S., Peschon, J., Johnson, P.R., et al. (1999). A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 4943–4951.

Casimiro, D.R., Chen, L., Fu, T.-M., Evans, R.K., Caulfield, M.J., Davies, M.-E., Tang, A., Chen, M., Huang, L., Harris, V., et al. (2003a). Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* **77**, 6305–6313.

Casimiro, D.R., Tang, A., Chen, L., Fu, T.-M., Evans, R.K., Davies, M.-E., Freed, D.C., Hurni, W., Aste-Amezaga, J.M., Guan, L., et al. (2003b). Vaccine-induced immunity in baboons by using DNA and replication-incompetent adenovirus type 5 vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* **77**, 7663–7668.

Cerboni, S., Gentili, M., and Manel, N. (2013). Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. *Adv. Immunol.* **120**, 211–237.

Cerutti, A., Puga, I., and Magri, G. (2013). The B cell helper side of neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 677–682.

Chakravarti, A., Allaeyns, I., and Poubelle, P.E. (2007). [Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]. *Med. Sci. MS* **23**, 862–867.

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

Chen, B. (2019). Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol.* **27**, 878–891.

Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242.

Chien, Y.H., Gascoigne, N.R., Kavaler, J., Lee, N.E., and Davis, M.M. (1984). Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* **309**, 322–326.

Chung, A.W., Isitman, G., Navis, M., Kramski, M., Center, R.J., Kent, S.J., and Stratov, I. (2011a). Immune escape from HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 7505–7510.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Y.-H., Lim, H., Reynolds, J.M., Zhou, X., et al. (2011b). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat. Med.* *17*, 983–988.

Cirelli, K.M., Carnathan, D.G., Nogal, B., Martin, J.T., Rodriguez, O.L., Upadhyay, A.A., Enemuo, C.A., Gebru, E.H., Choe, Y., Viviano, F., et al. (2019). Slow Delivery Immunization Enhances HIV Neutralizing Antibody and Germinal Center Responses via Modulation of Immunodominance. *Cell* *177*, 1153-1171.e28.

Clark, T.W., Pareek, M., Hoschler, K., Dillon, H., Nicholson, K.G., Groth, N., and Stephenson, I. (2009). Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *N. Engl. J. Med.* *361*, 2424–2435.

Clements, C.J., and Griffiths, E. (2002). The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine* *20 Suppl 3*, S24-33.

Collis, A.V.J., Brouwer, A.P., and Martin, A.C.R. (2003). Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J. Mol. Biol.* *325*, 337–354.

Combadière, B., Beaujean, M., Chaudeaigues, C., and Vieillard, V. (2019). Peptide-Based Vaccination for Antibody Responses Against HIV. *Vaccines* *7*, 105.

Coquery, C.M., Wade, N.S., Loo, W.M., Kinchen, J.M., Cox, K.M., Jiang, C., Tung, K.S., and Erickson, L.D. (2014). Neutrophils contribute to excess serum BAFF levels and promote CD4+ T cell and B cell responses in lupus-prone mice. *PloS One* *9*, e102284.

Council, O.D., and Joseph, S.B. (2018). Evolution of Host Target Cell Specificity During HIV-1 Infection. *Curr. HIV Res.* *16*, 13–20.

Cox, J.C., and Coulter, A.R. (1997). Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* *15*, 248–256.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.

Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* *41*, 529–542.

Crotty, S. (2015). A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 185–189.

Culshaw, S., Millington, O.R., Brewer, J.M., and McInnes, I.B. (2008). Murine neutrophils present Class II restricted antigen. *Immunol. Lett.* *118*, 49–54.

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 Boer, R.J. (2007). Time scales of CD4+ T cell depletion in HIV infection. *PLoS Med.* *4*, e193.

De Gregorio, E., and Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 505–514.

Deal, C.E., and Balazs, A.B. (2015). Vectored antibody gene delivery for the prevention or treatment of HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* *10*, 190–197.

deCamp, A., Hraber, P., Bailer, R.T., Seaman, M.S., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Gottardo, R., Edlefsen, P., Self, S., Tang, H., et al. (2014a). Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* *88*, 2489–2507.

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

Deenick, E.K., Ma, C.S., Brink, R., and Tangye, S.G. (2011). Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 111–118.

Del Giudice, G., Rappuoli, R., and Didierlaurent, A.M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin. Immunol.* *39*, 14–21.

Delaugerre, C., De Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J.-C., and Simon, F. (2011). HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *Lancet Lond. Engl.* *378*, 1894.

Dijkstra, J.M., and Yamaguchi, T. (2019). Ancient features of the MHC class II presentation pathway, and a model for the possible origin of MHC molecules. *Immunogenetics* *71*, 233–249.

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* *10*, 1292–1299.

Doitsh, G., Galloway, N.L.K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Muñoz-Arias, I., et al. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* *505*, 509–514.

Dolan, B.P., Gibbs, K.D., and Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 6018–6024.

Dorgham, K., Pietrancosta, N., Affoune, A., Lucar, O., Bouceba, T., Chardonnet, S., Pionneau, C., Piesse, C., Sterlin, D., Guardado-Calvo, P., et al. (2019). Reverse Immunology Approach to Define a New HIV-gp41-Neutralizing Epitope. *J. Immunol. Res.* *2019*, 1–13.

Duffy, D., Perrin, H., Abadie, V., Benhailles, N., Boissonnas, A., Liard, C., Descours, B., Reboulleau, D., Bonduelle, O., Verrier, B., et al. (2012). Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8+ T Cells. *Immunity* *37*, 917–929.

Dumas, A., and Pouliot, M. (2009). [Neutrophil: foe or friend?]. *Med. Sci. MS* *25*, 699–704.

Dupuis, M., Murphy, T.J., Higgins, D., Uguzzoli, M., van Nest, G., Ott, G., and McDonald, D.M. (1998). Dendritic Cells Internalize Vaccine Adjuvant after Intramuscular Injection. *Cell. Immunol.* *186*, 18–27.

Dupuis, M., McDonald, D.M., and Ott, G. (1999). Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice. *Vaccine* *18*, 434–439.

Dupuis, M., Denis-Mize, K., LaBarbara, A., Peters, W., Charo, I.F., McDonald, D.M., and Ott, G. (2001). Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2910–2918.

Earl, P.L., Moss, B., and Doms, R.W. (1991). Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* *65*, 2047–2055.

Edholm, E.-S., Bengten, E., and Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Dev. Comp. Immunol.* *35*, 1309–1316.

Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 778–786.

Engelman, A., and Cherepanov, P. (2012). The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 279–290.

English, L., Chemali, M., and Desjardins, M. (2009). Contribution de l'autophagie dans l'apprêtement d'antigènes viraux endogènes. *médecine/sciences* *25*, 906–909.

Falkowska, E., Le, K.M., Ramos, A., Doores, K.J., Lee, J.H., Blattner, C., Ramirez, A., Derking, R., van Gils, M.J., Liang, C.-H., et al. (2014). Broadly Neutralizing HIV Antibodies Define a Glycan-Dependent Epitope on the Prefusion Conformation of gp41 on Cleaved Envelope Trimers. *Immunity* *40*, 657–668.

Fausther-Bovendo, H., Vieillard, V., Sagan, S., Bismuth, G., and Debré, P. (2010). HIV gp41 Engages gC1qR on CD4+ T Cells to Induce the Expression of an NK Ligand through the PIP3/H2O2 Pathway. *PLoS Pathog.* *6*, e1000975.

Fazilleau, N., Eisenbraun, M.D., Malherbe, L., Ebright, J.N., Pogue-Caley, R.R., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2007). Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat. Immunol.* *8*, 753–761.

Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009a). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* *30*, 324–335.

Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009b). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* *10*, 375–384.

Ferraro, B., Morrow, M.P., Hutnick, N.A., Shin, T.H., Lucke, C.E., and Weiner, D.B. (2011). Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clin. Infect. Dis.* *53*, 296–302.

Février, M., Dorgham, K., and Rebollo, A. (2011). CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. *Viruses* *3*, 586–612.

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 Lond. Engl.* **17**, 1871–1879.

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

Flach, T.L., Ng, G., Hari, A., Desrosiers, M.D., Zhang, P., Ward, S.M., Seamone, M.E., Vilaysane, A., Mucsi, A.D., Fong, Y., et al. (2011). Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.* **17**, 479–487.

Franchi, L., and Núñez, G. (2008). The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2085–2089.

Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 484–496.

Freed, E.O., Myers, D.J., and Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4650–4654.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirosawa, S., Taniguchi, M., et al. (1997). Disruption of the Bcl6 Gene Results in an Impaired Germinal Center Formation. *J. Exp. Med.* **186**, 439–448.

Galli, S.J., and Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* **18**, 693–704.

Galli, G., Hancock, K., Hoschler, K., DeVos, J., Praus, M., Bardelli, M., Malzone, C., Castellino, F., Gentile, C., McNally, T., et al. (2009). Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7962–7967.

Ganor, Y., Real, F., Sennepin, A., Dutertre, C.-A., Prevedel, L., Xu, L., Tudor, D., Charmetieu, B., Couedel-Courteille, A., Marion, S., et al. (2019). HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat. Microbiol.* **4**, 633–644.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**, 436–441.

Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., and Nemazee, D. (2006). Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* **314**, 1936–1938.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.

Ghimire, D., Rai, M., and Gaur, R. (2018). Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* **99**, 435–446.

van Gils, M.J., van den Kerkhof, T.L.G.M., Ozorowski, G., Cottrell, C.A., Sok, D., Pauthner, M., Pallesen, J., de Val, N., Yasmeen, A., de Taeye, S.W., et al. (2016). An HIV-1 antibody from an elite neutralizer implicates the fusion peptide as a site of vulnerability. *Nat. Microbiol.* *2*, 16199.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* *44*, 439–449.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 392–404.

Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H., and Wallace, U. (1926). Immunological notes. XVII–XXIV. *J. Pathol. Bacteriol.* *29*, 31–40.

Glourey, R., Zotos, D., Zuidzcherwoude, M., Masson, F., Liao, Y., Hasbold, J., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Belz, G.T., Shi, W., et al. (2016). Dynamic changes in Id3 and E-protein activity orchestrate germinal center and plasma cell development. *J. Exp. Med.* *213*, 1095–1111.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 23–35.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.

Goto, N., and Akama, K. (1982). Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol. Immunol.* *26*, 1121–1132.

Greene, W.C. (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur. J. Immunol.* *37 Suppl 1*, S94–102.

Gregorio, E.D., Tritto, E., and Rappuoli, R. (2008). Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.* *38*, 2068–2071.

Grewal, I.S., Xu, J., and Flavell, R.A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* *378*, 617–620.

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

Guihot, A., Tubiana, R., Breton, G., Marcellin, A.-G., Samri, A., Assoumou, L., Goncalves, E., Bricaire, F., Costagliola, D., Calvez, V., et al. (2010). Immune and virological benefits of 10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* *24*, 614–617.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* *360*, 358–361.

Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., et al. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* *206*, 371–385.

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.-N., Malinarich, F., Malleret, B., et al. (2012). Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* 37, 60–73.

Hansen, S.G., Sacha, J.B., Hughes, C.M., Ford, J.C., Burwitz, B.J., Scholz, I., Gilbride, R.M., Lewis, M.S., Gilliam, A.N., Ventura, A.B., et al. (2013). Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms. *Science* 340, 1237874.

Hatzioannou, T., and Evans, D.T. (2012). Animal models for HIV/AIDS research. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 852–867.

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.

Haynes, B.F., Shaw, G.M., Korber, B., Kelsoe, G., Sodroski, J., Hahn, B.H., Borrow, P., and McMichael, A.J. (2016). HIV-Host Interactions: Implications for Vaccine Design. *Cell Host Microbe* 19, 292–303.

Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 5099–5108.

Hazenberg, M.D., Hamann, D., Schuitemaker, H., and Miedema, F. (2000). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat. Immunol.* 1, 285–289.

Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 495–504.

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., and WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation (2011). Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS Lond. Engl.* 25, 679–689.

Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., Ghys, P.D., and WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation Characterisation (2019). Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.* 19, 143–155.

Herschhorn, A., and Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cell. Mol. Life Sci. CMSL* 67, 2717–2747.

Heyndrickx, L., Heath, A., Sheik-Khalil, E., Alcamí, J., Bongertz, V., Jansson, M., Malnati, M., Montefiori, D., Moog, C., Morris, L., et al. (2012). International Network for Comparison of HIV Neutralization Assays: The NeutNet Report II. *PLoS ONE* 7, e36438.

Ho, D.D., McKeating, J.A., Li, X.L., Moudgil, T., Daar, E.S., Sun, N.C., and Robinson, J.E. (1991). Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J. Virol.* 65, 489–493.

Horwitz, J.A., Bar-On, Y., Lu, C.-L., Fera, D., Lockhart, A.A.K., Lorenzi, J.C.C., Nogueira, L., Golijanin, J., Scheid, J.F., Seaman, M.S., et al. (2017). Non-neutralizing Antibodies Alter the Course of HIV-1 Infection In Vivo. *Cell* **170**, 637–648.e10.

Huang, K.J., and Wooley, D.P. (2005). A new cell-based assay for measuring the forward mutation rate of HIV-1. *J. Virol. Methods* **124**, 95–104.

Huang, K.-H.G., Bonsall, D., Katzourakis, A., Thomson, E.C., Fidler, S.J., Main, J., Muir, D., Weber, J.N., Frater, A.J., Phillips, R.E., et al. (2010). B-cell depletion reveals a role for antibodies in the control of chronic HIV-1 infection. *Nat. Commun.* **1**, 102.

Hutchison, S., Benson, R.A., Gibson, V.B., Pollock, A.H., Garside, P., and Brewer, J.M. (2012). Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J.* **26**, 1272–1279.

Ismaili, J., Rennesson, J., Aksoy, E., Vekemans, J., Vincart, B., Amraoui, Z., Van Laethem, F., Goldman, M., and Dubois, P.M. (2002). Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 926–932.

Jansson, M., Popovic, M., Karlsson, A., Cocchi, F., Rossi, P., Albert, J., and Wigzell, H. (1996). Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15382–15387.

Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., et al. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* **189**, 991–998.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 557–569.

Johansen, P., Storni, T., Rettig, L., Qiu, Z., Der-Sarkissian, A., Smith, K.A., Manolova, V., Lang, K.S., Senti, G., Müllhaupt, B., et al. (2008). Antigen kinetics determines immune reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5189–5194.

Johnson, G., and Wu, T.T. (1998). Preferred CDRH3 lengths for antibodies with defined specificities. *Int. Immunol.* **10**, 1801–1805.

Johnston, C.T., Wang, S.-L., and Hem, S.L. (2002). Measuring the surface area of aluminum hydroxide adjuvant. *J. Pharm. Sci.* **91**, 1702–1706.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* **325**, 1006–1010.

Johnston, R.J., Choi, Y.S., Diamond, J.A., Yang, J.A., and Crotty, S. (2012). STAT5 is a potent negative regulator of T_{FH} cell differentiation. *J. Exp. Med.* **209**, 243–250.

Jordan, A., Defechereux, P., and Verdin, E. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* **20**, 1726–1738.

Kayagaki, N., Wong, M.T., Stowe, I.B., Ramani, S.R., Gonzalez, L.C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W.P., Muszyński, A., et al. (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* **341**, 1246–1249.

Khmaladze, I., Saxena, A., Nandakumar, K.S., and Holmdahl, R. (2015). B-cell epitope spreading and inflammation in a mouse model of arthritis is associated with a deficiency in reactive oxygen species production. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2243–2251.

Kim, C.H., Lim, H.W., Kim, J.R., Rott, L., Hillsamer, P., and Butcher, E.C. (2004). Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. *Blood* **104**, 1952–1960.

Kim, J.H., Excler, J.-L., and Michael, N.L. (2015). Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu. Rev. Med.* **66**, 423–437.

Klasse, P.J., Ketas, T.J., Cottrell, C.A., Ozorowski, G., Debnath, G., Camara, D., Francomano, E., Pugach, P., Ringe, R.P., LaBranche, C.C., et al. (2018a). Epitopes for neutralizing antibodies induced by HIV-1 envelope glycoprotein BG505 SOSIP trimers in rabbits and macaques. *PLoS Pathog.* **14**, e1006913.

Klasse, P.J., Ketas, T.J., Cottrell, C.A., Ozorowski, G., Debnath, G., Camara, D., Francomano, E., Pugach, P., Ringe, R.P., LaBranche, C.C., et al. (2018b). Epitopes for neutralizing antibodies induced by HIV-1 envelope glycoprotein BG505 SOSIP trimers in rabbits and macaques. *PLOS Pathog.* **14**, e1006913.

Klatt, N.R., Shudo, E., Ortiz, A.M., Engram, J.C., Paiardini, M., Lawson, B., Miller, M.D., Else, J., Pandrea, I., Estes, J.D., et al. (2010). CD8+ lymphocytes control viral replication in SIVmac239-infected rhesus macaques without decreasing the lifespan of productively infected cells. *PLoS Pathog.* **6**, e1000747.

Klatzmann, D., and Gluckman, J.C. (1986). HIV infection: facts and hypotheses. *Immunol. Today* **7**, 291–296.

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

Ko, E.-J., Lee, Y.-T., Kim, K.-H., Lee, Y., Jung, Y.-J., Kim, M.-C., Lee, Y.-N., Kang, T., and Kang, S.-M. (2017). Roles of Aluminum Hydroxide and Monophosphoryl Lipid A Adjuvants in Overcoming CD4+ T Cell Deficiency To Induce Isotype-Switched IgG Antibody Responses and Protection by T-Dependent Influenza Vaccine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**, 279–291.

Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869–882.

Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W.C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* **237**, 1351–1355.

Kumi Smith, M., Jewell, B.L., Hallett, T.B., and Cohen, M.S. (2018). Treatment of HIV for the Prevention of Transmission in Discordant Couples and at the Population Level. In HIV

Vaccines and Cure, L. Zhang, and S.R. Lewin, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 125–162.

Kwong, P.D., and Mascola, J.R. (2012). Human Antibodies that Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies. *Immunity* 37, 412–425.

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.

Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., et al. (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678–682.

Lambe, T., Spencer, A.J., Mullarkey, C.E., Antrobus, R.D., Yu, L.-M., de Whalley, P., Thompson, B.A.V., Jones, C., Chalk, J., Kerridge, S., et al. (2012). T-cell responses in children to internal influenza antigens, 1 year after immunization with pandemic H1N1 influenza vaccine, and response to revaccination with seasonal trivalent-inactivated influenza vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, e86–91.

Lelièvre, J.-D., and Lévy, Y. HIV-1 prophylactic vaccines: state of the art. *J. Virus Erad.* 2, 5–11.

Liang, F., Lindgren, G., Sandgren, K.J., Thompson, E.A., Francica, J.R., Seubert, A., Gregorio, E.D., Barnett, S., O'Hagan, D.T., Sullivan, N.J., et al. (2017). Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Sci. Transl. Med.* 9.

Lin, C.L., Sewell, A.K., Gao, G.F., Whelan, K.T., Phillips, R.E., and Austyn, J.M. (2000). Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendritic cell chemotaxis. *J. Exp. Med.* 192, 587–594.

Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982.

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, X., Yan, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Wang, A., Wang, X., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Chang, S.H., Esplugues, E., et al. (2012). Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1841–1852.

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

Lofano, G., Mancini, F., Salvatore, G., Cantisani, R., Monaci, E., Carrisi, C., Tavarini, S., Sammiceli, C., Rossi Paccani, S., Soldaini, E., et al. (2015). Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J. Immunol.* **195**, 1617–1627.

Lu, P., Shih, C., and Qi, H. (2017). Ephrin B1-mediated repulsion and signaling control germinal center T cell territoriality and function. *Science* **356**, eaai9264.

Lucar, O., Su, B., Potard, V., Samri, A., Autran, B., Moog, C., Debré, P., and Vieillard, V. (2017). Neutralizing Antibodies Against a Specific Human Immunodeficiency Virus gp41 Epitope are Associated With Long-term Non-progressor Status. *EBioMedicine* **22**, 122–132.

Luo, X., Mouquet, H., Schwartz, O., and Greene, W.C. (2021). Bystander CD4 T-cell death is inhibited by broadly neutralizing anti-HIV antibodies only at levels blocking cell-to-cell viral transmission. *J. Biol. Chem.* **101098**.

Lusic, M., and Siliciano, R.F. (2017). Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 69–82.

MacLennan, I.C. (1994). Somatic mutation. From the dark zone to the light. *Curr. Biol.* **4**, 70–72.

Madec, Y., Boufassa, F., Avettand-Fenoel, V., Hendou, S., Melard, A., Boucherit, S., Surzyn, J., Meyer, L., Rouzioux, C., and ANRS SEROCO/HEMOCO Study Group (2009). Early control of HIV-1 infection in long-term nonprogressors followed since diagnosis in the ANRS SEROCO/HEMOCO cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1999** **50**, 19–26.

Magiorkinis, G., Angelis, K., Mamaïs, I., Katzourakis, A., Hatzakis, A., Albert, J., Lawyer, G., Hamouda, O., Struck, D., Vercauteren, J., et al. (2016). The global spread of HIV-1 subtype B epidemic. *Infect. Genet. Evol.* **J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.** **46**, 169–179.

Mandel, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A., and Tew, J.G. (1980). The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol. Rev.* **53**, 29–59.

Mann, J.F.S., Shakir, E., Carter, K.C., Mullen, A.B., Alexander, J., and Ferro, V.A. (2009). Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection. *Vaccine* **27**, 3643–3649.

Marrack, P., McKee, A.S., and Munk, M.W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–293.

Martinon, F., Krishnan, S., Lenzen, G., Magné, R., Gomard, E., Guillet, J.G., Lévy, J.P., and Meulien, P. (1993). Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1719–1722.

Mascola, J.R., and Montefiori, D.C. (2010). The Role of Antibodies in HIV Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 413–444.

Matyas, G.R., Mayorov, A.V., Rice, K.C., Jacobson, A.E., Cheng, K., Iyer, M.R., Li, F., Beck, Z., Janda, K.D., and Alving, C.R. (2013). Liposomes containing monophosphoryl lipid A: a potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin haptens analogs. *Vaccine* **31**, 2804–2810.

Mbow, M.L., De Gregorio, E., Valiante, N.M., and Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 411–416.

McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* **83**, 387–395.

McColl, S.R. (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol. Cell Biol.* **80**, 489–496.

McDougal, J.S., Kennedy, M.S., Sligh, J.M., Cort, S.P., Mawle, A., and Nicholson, J.K. (1986). Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382–385.

McHeyzer-Williams, L.J., Milpied, P.J., Okitsu, S.L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2015a). Switched-memory B cells remodel B cell receptors within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* **16**, 296–305.

McHeyzer-Williams, L.J., Milpied, P.J., Okitsu, S.L., and McHeyzer-Williams, M.G. (2015b). Class-switched memory B cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* **16**, 296–305.

McSorley, S.J., Ehst, B.D., Yu, Y., and Gewirtz, A.T. (2002). Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* **169**, 3914–3919.

Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., and Boudaly, S. (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 977–988.

Metzemaekers, M., Gouwy, M., and Proost, P. (2020). Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 433–450.

Miller, J.F., and Mitchell, G.F. (1968). Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 801–820.

Mizel, S.B., and Bates, J.T. (2010). Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol. Baltim. Md* **185**, 5677–5682.

Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 235–245.

Moir, S., and Fauci, A.S. (2017). B cell responses to HIV infection. *Immunol. Rev.* **275**, 33–48.

Molad, Y., Buyon, J., Anderson, D.C., Abramson, S.B., and Cronstein, B.N. (1994). Intravascular neutrophil activation in systemic lupus erythematosus (SLE): dissociation between increased expression of CD11b/CD18 and diminished expression of L-selectin on neutrophils from patients with active SLE. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **71**, 281–286.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869–877.

Montefiori, D.C., and Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr. Opin. HIV AIDS* *4*, 347–351.

Morefield, G.L., Sokolovska, A., Jiang, D., HogenEsch, H., Robinson, J.P., and Hem, S.L. (2005). Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* *23*, 1588–1595.

Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhaye, S., Baras, B., Jacob, V., Planty, C., Elouahabi, A., Harvengt, P., Carlsen, H., et al. (2011). Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* *29*, 2461–2473.

Mosca, F., Tritto, E., Muzzi, A., Monaci, E., Bagnoli, F., Iavarone, C., O'Hagan, D., Rappuoli, R., and De Gregorio, E. (2008). Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10501–10506.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.

Mouquet, H., and Nussenzweig, M.C. (2012). Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1435–1445.

Mourez, T., Simon, F., and Plantier, J.-C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Microbiol. Rev.* *26*, 448–461.

Mulligan, M.J., Lyke, K.E., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Raabe, V., Bailey, R., Swanson, K.A., et al. (2020). Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* *586*, 589–593.

Münz, C. (2016). Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends Immunol.* *37*, 755–763.

Murooka, T.T., Deruaz, M., Marangoni, F., Vrbanac, V.D., Seung, E., von Andrian, U.H., Tager, A.M., Luster, A.D., and Mempel, T.R. (2012). HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature* *490*, 283–287.

Murthy, K.G.K., Deb, A., Goonesekera, S., Szabó, C., and Salzman, A.L. (2004). Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *J. Biol. Chem.* *279*, 5667–5675.

Musumeci, D., Riccardi, C., and Montesarchio, D. (2015). G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents. *Mol. Basel Switz.* *20*, 17511–17532.

Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L., and Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* *6*, e1000852.

Newman, M.J., Wu, J.Y., Gardner, B.H., Anderson, C.A., Kensil, C.R., Recchia, J., Coughlin, R.T., and Powell, M.F. (1997). Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1 gp120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations. *Vaccine* 15, 1001–1007.

Nguyen-Contant, P., Sangster, M.Y., and Topham, D.J. (2021). Squalene-Based Influenza Vaccine Adjuvants and Their Impact on the Hemagglutinin-Specific B Cell Response. *Pathogens* 10, 355.

Nishimura, Y., Brown, C.R., Mattapallil, J.J., Igarashi, T., Buckler-White, A., Lafont, B.A.P., Hirsch, V.M., Roederer, M., and Martin, M.A. (2005). Resting naive CD4+ T cells are massively infected and eliminated by X4-tropic simian-human immunodeficiency viruses in macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8000–8005.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138–149.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001–1005.

Oehler, L., Majdic, O., Pickl, W.F., Stöckl, J., Riedl, E., Drach, J., Rappersberger, K., Geissler, K., and Knapp, W. (1998). Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J. Exp. Med.* 187, 1019–1028.

Ott, G., Barchfeld, G.L., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., van Hoogeveest, P., and Van Nest, G. (1995). MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm. Biotechnol.* 6, 277–296.

Palmisano, L., Giuliano, M., Bucciardini, R., Fragola, V., Andreotti, M., Galluzzo, C., Pirillo, M.F., Weimer, L.E., Arcieri, R., Germinario, E.A.P., et al. (2007). Determinants of virologic and immunologic outcomes in chronically HIV-infected subjects undergoing repeated treatment interruptions: the Istituto Superiore di Sanita-Pulsed Antiretroviral Therapy (ISS-PART) study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 46, 39–47.

Pancera, M., Zhou, T., Druz, A., Georgiev, I.S., Soto, C., Gorman, J., Huang, J., Acharya, P., Chuang, G.-Y., Ofek, G., et al. (2014). Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature* 514, 455–461.

Pannus, P., Rutsaert, S., De Wit, S., Allard, S.D., Vanham, G., Cole, B., Nescoi, C., Aerts, J., De Spiegelaere, W., Tsoumanis, A., et al. (2020). Rapid viral rebound after analytical treatment interruption in patients with very small HIV reservoir and minimal on-going viral transcription. *J. Int. AIDS Soc.* 23, e25453.

Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331, 1203–1207.

Pardi, N., Hogan, M.J., Porter, F.W., and Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 261–279.

Pedersen, G.K., Wørzner, K., Andersen, P., and Christensen, D. (2020). Vaccine Adjuvants Differentially Affect Kinetics of Antibody and Germinal Center Responses. *Front. Immunol.* **11**, 579761.

Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koulagna, D., et al. (2002). Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 451–457.

Perrie, Y., Mohammed, A.R., Kirby, D.J., McNeil, S.E., and Bramwell, V.W. (2008). Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int. J. Pharm.* **364**, 272–280.

Petitdemange, C., Achour, A., Dispineri, S., Malet, I., Sennepin, A., Fang, R.H.T., Crouzet, J., Marcellin, A.-G., Calvez, V., Scarlatti, G., et al. (2013a). A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 745–755.

Petitdemange, C., Achour, A., Dispineri, S., Malet, I., Sennepin, A., Fang, R.H.T., Crouzet, J., Marcellin, A.-G., Calvez, V., Scarlatti, G., et al. (2013b). A Single Amino-Acid Change in a Highly Conserved Motif of gp41 Elicits HIV-1 Neutralization and Protects Against CD4 Depletion. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 745–755.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–971.

Pilcher, C.D., Tien, H.C., Eron, J.J., Vernazza, P.L., Leu, S.-Y., Stewart, P.W., Goh, L.-E., Cohen, M.S., Quest Study, and Duke-UNC-Emory Acute HIV Consortium (2004). Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV. *J. Infect. Dis.* **189**, 1785–1792.

Pilgrim, A.K., Pantaleo, G., Cohen, O.J., Fink, L.M., Zhou, J.Y., Zhou, J.T., Bolognesi, D.P., Fauci, A.S., and Montefiori, D.C. (1997). Neutralizing Antibody Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Primary Infection and Long-Term-Nonprogressive Infection. *J. Infect. Dis.* **176**, 924–932.

Plaforet, V. (2013). Follicular Dendritic Cells and the Humoral Response. *9*.

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

Podda, A. (2001). The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* **19**, 2673–2680.

Posner, M.R., Hidemitsu, T., Cannon, T., Mukherjee, M., Mayer, K.H., and Byrn, R.A. (1991). An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J. Immunol.* **146**, 4325–4332.

Pratama, A., and Vinuesa, C.G. (2014). Control of TFH cell numbers: why and how? *Immunol. Cell Biol.* **92**, 40–48.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2012). B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* *13*, 170–180.

Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y.C., and Germain, R.N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* *312*, 1672–1676.

Radsak, M., Iking-Konert, C., Stegmaier, S., Andrassy, K., and Hänsch, G.M. (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* *101*, 521–530.

Radtke, A.J., Anderson, C.F., Riteau, N., Rausch, K., Scaria, P., Kelnhof, E.R., Howard, R.F., Sher, A., Germain, R.N., and Duffy, P. (2017). Adjuvant and carrier protein-dependent T-cell priming promotes a robust antibody response against the *Plasmodium falciparum* Pfs25 vaccine candidate. *Sci. Rep.* *7*, 40312.

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

Rappuoli, R., Santoni, A., and Mantovani, A. (2019). Vaccines: An achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. *J. Exp. Med.* *216*, 7–9.

Reif, K., Ekland, E.H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Förster, R., and Cyster, J.G. (2002). Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* *416*, 94–99.

Richards, K.H., Aasa-Chapman, M.M., McKnight, A., and Clapham, P.R. (2010). Modulation of HIV-1 macrophage-tropism among R5 envelopes occurs before detection of neutralizing antibodies. *Retrovirology* *7*, 48.

Ridderstad, A., and Tarlinton, D.M. Kinetics of Establishing the Memory B Cell Population as Revealed by CD38 Expression. *J. Immunol.* *8*.

Rizza, P., Ferrantini, M., Capone, I., and Belardelli, F. (2002). Cytokines as natural adjuvants for vaccines: where are we now? *Trends Immunol.* *23*, 381–383.

Roberts, J.D., Bebenek, K., and Kunkel, T.A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* *242*, 1171–1173.

Robey, W.G., Safai, B., Oroszlan, S., Arthur, L.O., Gonda, M.A., Gallo, R.C., and Fischinger, P.J. (1985). Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* *228*, 593–595.

Robinson, C., Baehr, C., Schmiel, S.E., Accetturo, C., Mueller, D.L., and Pravettoni, M. (2019). Alum adjuvant is more effective than MF59 at prompting early germinal center formation in response to peptide-protein conjugates and enhancing efficacy of a vaccine against opioid use disorders. *Hum. Vaccines Immunother.* *15*, 909–917.

Rodger, A.J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., van Lunzen, J., Corbelli, G.M., Estrada, V., Geretti, A.M., Beloukas, A., et al. (2016). Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA* *316*, 171–181.

Roman, F., Vaman, T., Gerlach, B., Markendorf, A., Gillard, P., and Devaster, J.-M. (2010). Immunogenicity and safety in adults of one dose of influenza A H1N1v 2009 vaccine formulated with and without AS03A-adjuvant: preliminary report of an observer-blind, randomised trial. *Vaccine* *28*, 1740–1745.

Roozendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* *30*, 264–276.

Rosenthal, A.S., and Shevach, E.M. (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* *138*, 1194–1212.

Salomon, B., and Bluestone, J.A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 Costimulatory Pathways in Autoimmunity and Transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 225–252.

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. *J. Virol.* *76*, 7293–7305.

Sanders, R.W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeen, A., de Val, N., Kim, H.J., Blattner, C., de la Peña, A.T., Korzun, J., et al. (2013). A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* *9*, e1003618.

Sanders, R.W., van Gils, M.J., Derking, R., Sok, D., Ketas, T.J., Burger, J.A., Ozorowski, G., Cupo, A., Simonich, C., Goo, L., et al. (2015). HIV-1 VACCINES. HIV-1 neutralizing antibodies induced by native-like envelope trimers. *Science* *349*, aac4223.

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

Sarzotti-Kelsoe, M., Bailer, R.T., Turk, E., Lin, C., Bilska, M., Greene, K.M., Gao, H., Todd, C.A., Ozaki, D.A., Seaman, M.S., et al. (2014). Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods* *409*, 131–146.

Sattentau, Q.J., Moore, J.P., Vignaux, F., Traincard, F., and Poignard, P. (1993). Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* *67*, 7383–7393.

Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., et al. (2005). Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood* *105*, 830–837.

Scapini, P., Bazzoni, F., and Cassatella, M.A. (2008). Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol. Lett.* **116**, 1–6.

Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M.S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R.G., Anthony, R.M., Zebroski, H., Hurley, A., et al. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**, 636–640.

Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* **38**, 970–983.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–52.

Schroeder, H.W., Radbruch, A., and Berek, C. (2019). B-Cell Development and Differentiation. In *Clinical Immunology*, (Elsevier), pp. 107–118.e1.

Seeber, S.J., White, J.L., and Hem, S.L. (1991). Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* **9**, 201–203.

Seubert, A., Monaci, E., Pizza, M., O'Hagan, D.T., and Wack, A. (2008). The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 5402–5412.

Shen, R., Raska, M., Bimczok, D., Novak, J., and Smith, P.D. (2014). HIV-1 envelope glycan moieties modulate HIV-1 transmission. *J. Virol.* **88**, 14258–14267.

Shi, W., Liao, Y., Willis, S.N., Taubenheim, N., Inouye, M., Tarlinton, D.M., Smyth, G.K., Hodgkin, P.D., Nutt, S.L., and Corcoran, L.M. (2015). Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nat. Immunol.* **16**, 663–673.

Shi, Y., Evans, J.E., and Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516–521.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855–867.

Shoko, C., and Chikobvu, D. (2019). A superiority of viral load over CD4 cell count when predicting mortality in HIV patients on therapy. *BMC Infect. Dis.* **19**, 169.

Siliciano, R.F., and Greene, W.C. (2011). HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a007096.

Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., Lehrman, J.K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miilo, G., et al. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a

high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J. Virol.* **83**, 7337–7348.

Smith, K.G., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1995). FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11628–11632.

Smyth, R.P., and Negroni, M. (2016). A step forward understanding HIV-1 diversity. *Retrovirology* **13**, 27.

Sokolovska, A., Hem, S.L., and HogenEsch, H. (2007). Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* **25**, 4575–4585.

Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 261–292.

Suan, D., Sundling, C., and Brink, R. (2017a). Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr. Opin. Immunol.* **45**, 97–102.

Suan, D., Kräutler, N.J., Maag, J.L.V., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J.R., Avery, D.T., Young, C., Statham, A., Elliott, M., et al. (2017b). CCR6 Defines Memory B Cell Precursors in Mouse and Human Germinal Centers, Revealing Light-Zone Location and Predominant Low Antigen Affinity. *Immunity* **47**, 1142-1153.e4.

Tam, H.H., Melo, M.B., Kang, M., Pelet, J.M., Ruda, V.M., Foley, M.H., Hu, J.K., Kumari, S., Crampton, J., Baldeon, A.D., et al. (2016). Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E6639–E6648.

Tarlinton, D., and Good-Jacobson, K. (2013). Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility. *Science* **341**, 1205–1211.

Taylor, B.S., and Hammer, S.M. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1965–1966.

Tebit, D.M., Nankya, I., Arts, E.J., and Gao, Y. (2007). HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness “fit” into the puzzle? *AIDS Rev.* **9**, 75–87.

Thompson, B.S., Chilton, P.M., Ward, J.R., Evans, J.T., and Mitchell, T.C. (2005). The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1273–1280.

Tincati, C., Douek, D.C., and Marchetti, G. (2016). Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *AIDS Res. Ther.* **13**, 19.

Tomaras, G.D., and Plotkin, S.A. (2017). Complex immune correlates of protection in HIV-1 vaccine efficacy trials. *Immunol. Rev.* **275**, 245–261.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581.

Trigunaite, A., Khan, A., Der, E., Song, A., Varikuti, S., and Jørgensen, T.N. (2013). Gr-1(high) CD11b+ cells suppress B cell differentiation and lupus-like disease in lupus-prone male mice. *Arthritis Rheum.* *65*, 2392–2402.

Tudor, D., Dubuquoy, C., Gaboriau, V., Lefèvre, F., Charley, B., and Riffault, S. (2005). TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine* *23*, 1258–1264.

Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* *285*, 1–32.

Ueno, H., Klechovsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* *219*, 118–142.

Ulmer, J.B., Wahren, B., and Liu, M.A. (2006). DNA vaccines for HIV/AIDS. *Curr. Opin. HIV AIDS* *1*, 309–313.

Varricchi, G., Harker, J., Borriello, F., Marone, G., Durham, S.R., and Shamji, M.H. (2016). T follicular helper (Tfh) cells in normal immune responses and in allergic disorders. *Allergy* *71*, 1086–1094.

Vessière, A., Rousset, D., Kfutwah, A., Leoz, M., Depatureaux, A., Simon, F., and Plantier, J.-C. (2010). Diagnosis and monitoring of HIV-1 group O-infected patients in Cameroun. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *1999* *53*, 107–110.

Victora, G.D., and Mouquet, H. (2018). What Are the Primary Limitations in B-Cell Affinity Maturation, and How Much Affinity Maturation Can We Drive with Vaccination? Lessons from the Antibody Response to HIV-1. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*, a029389.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.

Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* *143*, 592–605.

Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* *5*, 520.

Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debré, P. (2005a). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10981–10986.

Vieillard, V., Strominger, J.L., and Debre, P. (2005b). NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: A gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10981–10986.

Vieillard, V., Costagliola, D., Simon, A., Debré, P., and Group, F.A. à L.T. (ALT) S. (2006). Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection. *Aids* *20*, 1795–1804.

- Vieillard, V., Le Grand, R., Dausset, J., and Debre, P. (2008). A vaccine strategy against AIDS: An HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 2100–2104.
- Vieillard, V., Fausther-bovendo, H., Samri, A., and Debré, P. (2010). Specific Phenotypic and Functional Features of Natural Killer Cells From Hiv-infected Long-term Nonprogressors and Hiv Controllers. *Jaids J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *53*, 564–573.
- Vieillard, V., Gharakhanian, S., Lucar, O., Katlama, C., Launay, O., Autran, B., Ho Tsong Fang, R., Crouzet, J., Murphy, R.L., and Debré, P. (2016). Perspectives for immunotherapy: which applications might achieve an HIV functional cure? *Oncotarget* *7*, 38946–38958.
- Vieillard, V., Combadière, B., Tubiana, R., Launay, O., Pialoux, G., Cotte, L., Girard, P.-M., Simon, A., Dudoit, Y., Reynes, J., et al. (2019). HIV therapeutic vaccine enhances non-exhausted CD4+ T cells in a randomised phase 2 trial. *NPJ Vaccines* *4*.
- Villadangos, J.A., and Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1131–1134.
- Vinuesa, C.G., and Cyster, J.G. (2011). How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* *35*, 671–680.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 335–368.
- Volmink, J., and Marais, B. (2008). HIV: mother-to-child transmission. *BMJ Clin. Evid.* *2008*, 0909.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M. (1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* *40*, 9–17.
- Walker, B.D. (2007). Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top. HIV Med. Publ. Int. AIDS Soc. USA* *15*, 134–136.
- Wang, C., Hillsamer, P., and Kim, C.H. (2011). Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets. *BMC Immunol.* *12*, 53.
- Wang, C., Hart, M., Chui, C., Ajugou, A., Brian, I.J., de Cassan, S.C., Borrow, P., Draper, S.J., and Douglas, A.D. (2016). Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Responses to Viral Vector and Protein-in-Adjuvant Vaccines. *J. Immunol.*
- 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.
- Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). Molecular Mechanisms of HIV Entry. In *Viral Molecular Machines*, M.G. Rossmann, and V.B. Rao, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 223–242.

Wu, J.Y., Gardner, B.H., Murphy, C.I., Seals, J.R., Kensil, C.R., Recchia, J., Beltz, G.A., Newman, G.W., and Newman, M.J. (1992). Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *148*, 1519–1525.

Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., et al. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179–183.

Xie, M., Leroy, H., Mascarau, R., Woottum, M., Dupont, M., Ciccone, C., Schmitt, A., Raynaud-Messina, B., Vérollet, C., Bouchet, J., et al. (2019). Cell-to-Cell Spreading of HIV-1 in Myeloid Target Cells Escapes SAMHD1 Restriction. *MBio* 10.

Xu, K., Acharya, P., Kong, R., Cheng, C., Chuang, G.-Y., Liu, K., Louder, M.K., O'Dell, S., Rawi, R., Sastry, M., et al. (2018). Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1. *Nat. Med.* 24, 857–867.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.

Yu, D., and Vinuesa, C.G. (2010). The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol.* 31, 377–383.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* 31, 457–468.

Yusuf, I., Kageyama, R., Monticelli, L., Johnston, R.J., Ditoro, D., Hansen, K., Barnett, B., and Crotty, S. (2010). Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *185*, 190–202.

Zeller, J.M., McCain, N.L., and Swanson, B. (1996). Immunological and virological markers of HIV-disease progression. *J. Assoc. Nurses AIDS Care JANAC* 7, 15–27.

Zhang, X., Li, L., Choe, J., Krajewski, S., Reed, J.C., Thompson, C., and Choi, Y.S. (1996). Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis. *Cell. Immunol.* 173, 149–154.

Zheng, D., Yi, Y., and Chen, Z. (2012). Development of live-attenuated influenza vaccines against outbreaks of H5N1 influenza. *Viruses* 4, 3589–3605.

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, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., and Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594–597.

Zinkernagel, R.M., and Doherty, P.C. (1974). Characteristics of the interaction in vitro between cytotoxic thymus-derived lymphocytes and target monolayers infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Scand. J. Immunol.* 3, 287–294.

Zolla-Pazner, S. (2004). Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 199–210.

Zolla-Pazner, S., Zhong, P., Revesz, K., Volsky, B., Williams, C., Nyambi, P., and Gorny, M.K. (2004). The cross-clade neutralizing activity of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 1254–1258.

Zolla-Pazner, S., deCamp, A., Gilbert, P.B., Williams, C., Yates, N.L., Williams, W.T., Howington, R., Fong, Y., Morris, D.E., Soderberg, K.A., et al. (2014). Vaccine-Induced IgG Antibodies to V1V2 Regions of Multiple HIV-1 Subtypes Correlate with Decreased Risk of HIV-1 Infection. *PLOS ONE* 9, e87572.